

Université de Montréal

IMPLICATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE DANS UN MODELE DE SCLEROSE LATERALE  
AMYOTROPHIQUE CHEZ *C. elegans*

par Julie Vérièpe

Unité académique Pathologie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de  
Docteur en Pathologie et Biologie Cellulaire, option système nerveux

Août 2016

©, Julie Vérièpe, 2016





## RESUME

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une pathologie complexe multifactorielle dont les mécanismes de dégénérescence des motoneurones et de propagation rapide au sein du système nerveux sont encore incertains. Par l'utilisation du nématode *Caenorhabditis elegans*, nous avons pu investiguer génétiquement et pharmacologiquement certains facteurs entrant en jeu dans la toxicité de TDP-43 et FUS. Des mutations dominantes dans ces protéines liant l'ADN et l'ARN, structurellement et fonctionnellement proches, sont des causes de SLA familiales. Nous avons, par le passé, construit un modèle de ver transgénique possédant le gène *TARDBP* ou *FUS* codant respectivement pour les protéines humaines TDP-43 ou FUS, sous le contrôle d'un promoteur exprimé seulement dans les neurones GABAergiques. Uniquement lorsque les gènes *TARDBP* ou *FUS* sont mutés, des symptômes relatifs à la SLA apparaissent au cours du temps, à savoir une paralysie progressive et une neurodégénérescence des motoneurones GABAergiques. Nous avons voulu connaître le rôle que pouvait jouer le système immunitaire, dont des évidences croissantes montrent une implication dans la SLA, dans la protéotoxicité liée à ces protéines dans nos modèles de ver. Dans un premier temps, nous avons évalué la motricité des vers en milieu solide et en milieu liquide, et grâce à des vers transgéniques exprimant la GFP dans les neurones GABAergiques, nous avons pu quantifier la neurodégénérescence. Nos résultats soulignent un rôle prévalent de l'orthologue de la protéine du système immunitaire innée Sarm1 chez le ver, TIR-1, ainsi que les kinases en aval dans la pathologie. Nous avons pu, de surcroît, utiliser le marqueur NLP-29 dont le promoteur lié à la GFP nous indique l'activation de la voie Sarm1 dans l'ensemble du ver et non seulement dans les neurones. De manière intéressante, l'activation de ces protéines se produit entre autres dans des cellules non-neuronales de manière paracrine suggérant qu'un signal de danger opère extracellulairement et vraisemblablement à travers un récepteur membranaire. Ces dernières années, un nombre important d'études met en lumière le rôle proéminent des microARNs dans des maladies telle que la SLA. Classiquement vus comme des régulateurs de l'expression post-transcriptionnelle, ce qui en font notamment des outils antiviraux puissants, ils peuvent agir à d'autres niveaux et notamment comme ligands de récepteurs Toll-like (TLRs), eux aussi impliqués dans la SLA.

Outre le potentiel biomarqueur de ces petites molécules, nous avons investigué leur rôle dans la neurodégénérescence observée dans la SLA. Ainsi, dans une deuxième partie d'étude, nous avons utilisé des mutants pour différentes protéines impliquées dans la biogénèse des microARNs et trouvé qu'elles étaient partie intégrante du processus de paralysie et de dégénérescence des vers TDP-43<sup>A315T</sup>. Plus encore, le microARN let-7 pourrait être une molécule signal transitant entre les neurones et les cellules avoisinantes. Enfin, des analyses bio-statistiques prédisent la possibilité que let-7 se lie au récepteur TOL-1, l'unique orthologue des TLRs chez *C. elegans*. Les propriétés des microARNs en font en effet des cibles de choix dans la recherche de nouveaux acteurs dans la SLA et de potentielles cibles thérapeutiques.

Mots clés : *C. elegans*, sclérose latérale amyotrophique, TDP-43, FUS, dégénérescence, système immunitaire, microARN, let-7, récepteur Toll-like, propagation trans-cellulaire.

## ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis is a complex multifactorial pathology characterized by the progressive spread of motor neuron degeneration. Unfortunately, the underlying disease mechanisms remain unclear. By using the nematode *Caenorhabditis elegans*, we were able to investigate genetically and pharmacologically some factors involved in TDP-43 or FUS proteotoxicity. Dominant mutations in these structurally and functionally similar DNA/RNA binding proteins, are causative for familial ALS. We have constructed transgenic *C. elegans* models expressing human *TARDBP* or *FUS* genes - encoding respectively TDP-43 and FUS - only in GABAergic motor neurons. In these transgenic animals, the expression of mutant *TARDBP* or *FUS* alleles results in early the motor deficits leading to age-dependent paralysis accompanied by neuronal protein aggregation. Using transgenic strain expressing GFP in GABAergic neurons, we found an increased rate of neurodegeneration in TDP-43 and FUS mutants. With these models we investigated the potential role of the innate immune system as a modifier of these phenotypes. Our results highlight a prevalent role for the worm's innate immune system, and specifically the TIR-1/Sarm1 pathway and associated downstream kinases in neurodegeneration. We used GFP fluorescence linked to NLP-29 promoter to indicate Sarm1 pathway activation in the entire worm. Interestingly, activation of the TIR-1/Sarm1 pathway occurs in a paracrine manner in non-neuronal cells, suggesting that a danger signal operates extracellularly likely through a membrane receptor. In a past few years, a number of studies have highlighted the prominent role of microRNAs in diseases such as ALS. Traditionally seen as post-transcriptional regulators, what makes them powerful antiviral tools is that they can act at other levels and in particular as Toll-like receptors (TLRs) ligands, also involved in ALS. In addition to the biomarker potential of these small molecules, we investigated their role in the neurodegeneration observed in ALS. As a result, in the a second section of this study, we used worms mutant for several proteins involved in the biogenesis of microRNAs and found that they were involved in the process of TDP-43<sup>A315T</sup>-independent paralysis and neurodegeneration. Moreover, the microRNA let-7 seems to be a signal molecule involved in the non-cell autonomous trans-neuronal and trans-cellular spread of motor neuron degeneration. Finally, bio-statistical analyzes predict the possibility that let-7 binds to the

TOL-1 receptor, the single ortholog of TLRs in *C. elegans*. Thus microRNAs may be prime targets for ALS therapeutic intervention.

Key words : *C. elegans*, Amyotrophic lateral sclerosis, TDP-43, FUS, degeneration, immune system, microRNA, let-7, Toll-like, receptor, trans-cellular spread.

# TABLE DES MATIERES

RESUME.....	iii
TABLE DES MATIERES.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ANNEXES.....	xii
LISTE DES ACRONYMES & ABRÉVIATIONS.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xvii
EPIGRAPHE.....	xix
I. Introduction.....	1
I.1. LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE.....	1
I.1.1. Description et épidémiologie.....	1
I.1.2. Les formes sporadiques.....	3
I.1.3. Les formes familiales.....	4
I.1.3.1. <i>SOD1</i> .....	4
I.1.3.2. <i>TDP-43</i> .....	6
I.1.3.3. <i>FUS/TLS</i> .....	9
I.1.3.4. <i>C9ORF72</i> .....	10
I.1.3.5. <i>Autres gènes en cause</i> .....	12
I.1.4. Les perturbations métaboliques.....	14
I.1.5. Modèles de sclérose latérale amyotrophique chez <i>C. elegans</i> .....	18
I.2. LE ROLE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE DANS LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE.....	22
I.2.1. Evidences d'une réponse immune dans la sclérose latérale amyotrophique.....	22
I.2.1.1. <i>Au niveau cellulaire</i> .....	22
I.2.1.2. <i>Au niveau moléculaire</i> .....	23
I.2.1.3. <i>Les récepteurs Toll-like</i> .....	25
I.2.2. Mort neuronale et implication de Sarm1/TIR-1.....	30
I.2.2.1. <i>Les différentes morts cellulaires</i> .....	30
I.2.2.2. <i>Les signaux de danger</i> .....	32
I.2.2.3. <i>Nécroptose dans la SLA et implication de Sarm1/TIR-1</i> .....	32
I.2.3. Implication des MAPKs.....	35
I.2.4. L'immunité chez <i>C. elegans</i> .....	37
I.3. LE PROCESSUS DE DIFFUSION DANS LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE : ROLE DES MICROARNs.....	44
I.3.1. La diffusion.....	44
I.3.2. Définitions et fonctions physiologiques des microARNs.....	47
I.3.2.1. <i>Structure</i> .....	47
I.3.2.2. <i>Actions</i> .....	48
I.3.2.3. <i>Spécificité</i> .....	49
I.3.2.4. <i>Communication inter-cellulaire</i> .....	51
I.3.2.5. <i>Biogénèse</i> .....	54
I.3.3. Rôle des microARNs dans la sclérose latérale amyotrophique.....	56

I.3.3.1. <i>Liens entre microARNs, leur biogénèse et les protéines liées à la sclérose latérale amyotrophique</i> .....	57
I.3.3.2. <i>Dérégulation globale des microARNs dans la sclérose latérale amyotrophique</i> .....	58
I.3.3.3. <i>Action de microARNs individuels dans les processus neurodégénératifs de la sclérose latérale amyotrophique</i> .....	60
I.3.4. <i>let-7 : un microARN crucial dans la sclérose latérale amyotrophique</i> .....	61
I.4. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES ET HYPOTHÈSES .....	64
II. Résultats .....	67
II.1. MANUSCRIT 1 : NEURODEGENERATION IN <i>C. elegans</i> MODELS OF ALS REQUIRES TIR-1/SARM1 IMMUNE PATHWAY ACTIVATION IN NEURONS.....	67
II.2. MANUSCRIT 2 : TRANSCELLULAR SPREAD OF MOTOR NEURON DEGENERATION VIA TIR-1/Sarm1 AND THE MICRORNA let-7 .....	105
III. Discussion .....	135
III. 1. LA DÉGÉNÉRESCENCE DES NEURONES MOTEURS DANS LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE.....	135
III. 2. LA PROPAGATION TRANS-CELLULAIRE .....	138
III. 3. LES RÉACTIONS INTRACELLULAIRES EN RÉPONSE A UN SIGNAL DE DANGER.....	149
III. 4. LES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES POTENTIELLES.....	152
IV. Conclusion et perspectives.....	156
V. Bibliographie .....	159
VI. Annexes.....	199
ANNEXE 1 .....	xx
ANNEXE 2 .....	liv
ANNEXE 3 .....	lxxiii
ANNEXE 4 .....	lxxv
ANNEXE 5 .....	lxxviii
ANNEXE 6 .....	lxxxix

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Variabilité de la progression de la maladie chez 30 patients différents pris au hasard.

Figure 2 : Structure primaire du gène *SOD1* et de sa protéine.

Figure 3 : Structure primaire du gène *TARDBP* et de sa protéine TDP-43.

Figure 4 : Structure primaire du gène *FUS* et de sa protéine.

Figure 5 : Paralysie et neurodégénérescence des neurones GABAergiques induites par TDP-43<sup>A315T</sup> ou FUS<sup>S57Δ</sup>.

Figure 6 : Augmentation de l'expression des TLR2 et TLR4.

Figure 7 : Le TLR4 aggrave les déficits moteurs et réduit la longévité dans un modèle de souris *SOD1*<sup>G93A</sup>.

Figure 8 : Dégénérescence axonale induite par la protéine Sarm1, et son homologue chez *C. elegans*.

Figure 9 : Voie intracellulaire chez les mammifères de l'activation de la voie Sarm1 dans un cas de dégénérescence.

Figure 10 : Comparaison simplifiée de la voie des MAP-kinases chez les mammifères et chez *C. elegans*.

Figure 11 : Systèmes immunitaires de *C. elegans*.

Figure 12 : Modèle idéalisé de la diffusion de la SLA à partir d'un point focal.

Figure 13 : Structure en épingle à cheveux de microARN miR-1 chez *C. elegans*.

Figure 14 : Biogénèse des microARNs.

Figure 15 : Structures primaires et secondaires de let-7.

Figure 16 : Localisation de FUS dans les neurones GABAergiques.

Figure 17 : Localisation de TDP-43<sup>WT</sup> dans les neurones GABAergiques.

Figure 18 : Localisation de TDP-43<sup>A315T</sup> dans les neurones GABAergiques.

Figure 19 : Schéma bilan des processus entrant dans la dégénérescence neuronale dans la SLA.

Figure 20 : Modifications chimiques d'oligonucléotides antisens.



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Gènes associés à la SLA, protéine associée et fonction, et nombre de cas répertoriés.

## LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : TDP-43 TOXICITY PROCEEDS VIA CALCIUM DYSREGULATION AND NECROSIS IN AGING *Caenorhabditis Elegans* MOTOR NEURONS

Annexe 2 miRNAs dérégulés dans la SLA décrits actuellement.

Annexe 3 : PROTOCOLE D'IMMUNOMARQUAGE DE TDP-43 SUR *C. elegans*.

Annexe 4 : Quantification de sous-types de let-7 dans des cellules lymphoblastoïdes de patients ayant la SLA.

Annexe 5 : Etudes cliniques portant sur la sclérose latérale amyotrophique des 10 dernières années au début 2016.

Annexe 6 : Etudes cliniques ayant porté sur les microARNs au début 2016.

## LISTE DES ACRONYMES & ABRÉVIATIONS

aa : Acide-aminé  
ABF-1/ABF-2 : Antibacterial factor -1/ Antibacterial factor -2  
Ach : Acétylcholine  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADR/ADAR : Adenosine deaminase acting on RNA  
AGO1/AGO2 : Argonaute -1/ Argonaute -2  
AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid  
ANG : Angiogenine  
ARM : Heat/Armadillo domain  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNi : Acide ribonucléique interférent  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
ARNnc : Acide ribonucléique non codant  
ARNpi : ARN Piwi  
ARNsno : small nucleolar ARN  
ARNti : tRNA-derived stress-induced RNA  
Asp : Aspartyl  
ATF-7 : Activating transcription factor -7  
ATP : Adénosine triphosphate  
BCL-2 : B-cell lymphoma 2  
C9ORF72 : Chromosome 9 open reading frame 72  
Calnx : Calnexine  
Calp : Calpaïne  
Calrt : Calreticuline  
Cf. : Confer  
CFTR : Cystic fibrosis transmembrane regulator  
chAT : Choline acetyltransferase  
CLC : C-type lectin receptor  
CNX-1 : Calnexin -1  
CRT-1 : Calreticulin -1  
DAF-4 : Abnormal dauer formation -4  
DAMP : Damage-associated molecular pattern  
DBL-1 : DPP/BMP-like  
DBR : Lariat debranching enzyme  
DCAR-1 : DihydroCaffeic Acid Receptor -1  
DENN : Differentially expressed in normal and neoplastic cell  
DFT : Démence fronto-temporale  
DCS-1 : Decapping scavenger enzyme -1  
DCRG8 : DiGeorge syndrome chromosomal region 8  
DLK : Dual leucine zipper kinase  
Dr. : Docteur/Doctor  
dsarm : Drosophila sterile  $\alpha$  and TIR motif containing 1  
EAAT2 : Excitotoxic amino acid transporter 2  
EGTA : Ethylene glycol tetraacetic acid

ERK : Extracellular signal-regulated kinase 1  
 E.U. : Etats-Unis  
 EWSR1 : Ewing sarcoma RNA-binding protein -1  
 FcγRI: Fragment crystallizable region gamma receptor I  
 FUDR : Fluorodeoxyuridine  
 FUS/TLS : Fused in sarcoma/translocated in sarcoma  
 GABA : γ-aminobutyric acid  
 GAPDH ou GADPH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
 GEF : Guanine nucleotide exchange factor  
 GFAP : Glial fibrillary acidic protein  
 hbl-1 : Hunchback-like -1  
 HMGB1 : High-mobility group box 1 protein  
 hnRNPA2B1 : Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1  
 HSP-70 : Heat shock protein -70  
 Iba-1 : Ionised calcium-binding adapter molecule -1  
 ICAM-1 : Inter-cellular adhesion molecule -1  
 Ig : Immunoglobuline  
 IGF-1 : Insulin-growth factor -1  
 IL-1β : Interleukin-1β  
 IL-6 : Interleukin-6  
 IL-10 : Interleukin-10  
 ITR-1 : Inositol 1,4,5 triphosphate  
 JNK : Jun N terminal kinase  
 LCR : Liquide céphalorachidien  
 let-7 : Lethal -7  
 lin-4 : Abnormal cell lineage -4  
 lin-41 : Abnormal cell lineage -41  
 lin-45 : Abnormal cell lineage -45  
 lincRNA : Large intergenic non-coding ARN  
 LNA : Locked nucleic acid  
 lncRNA : Long non-coding ribonucleic acid  
 LPS : Lipopolysaccharides  
 LRR : Leucin-rich repeat  
 MAO : Monoamine oxydase  
 MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
 MAPKKK : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase  
 MEF-2 : Myocyte enhancer factor-2  
 MEK-2 : Mitogen-activated protein kinase -2  
 MEKK4 : Mitogen-activated protein kinase kinase -4  
 MLK-2 : Mixed lineage kinase -2  
 MLKL : Mixed lineage kinase-like domain  
 mm : millimètre  
 MPK-1 : MAP-kinase -1  
 mTOR : mammalian target of rapamycin.  
 NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide adenine dinucleotide  
 NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
 nasp-1 : Human nuclear autoantigenic sperm protein homolog

NES : Nuclear export signal  
 NF-  $\kappa$ B : nuclear factor- $\kappa$ B  
 NGM : Nematode growth medium  
 NK : Natural Killer  
 NLP-29/NLP-31 : Neuropeptide-like protein -29/ Neuropeptide-like protein -31  
 NLR : NOD-like receptor  
 NLS : Nuclear localization signal  
 NMDA : N-Methyl-D-aspartic acid  
 NSY-1 : Neuronal symmetry -1  
 PACT : Protein activator of the interferon-induced protein kinase  
 PAMP : Pathogen-associated molecular pattern  
 PASRs : Promoter-associated small RNAs  
 PET : Positron emission tomography  
 PMK-1 : P38 MAP-Kinase family -1  
 PNPase : Polynucleotide phosphorylase  
 PROMPT : Promoter upstream transcripts  
 QGSY : Glutamate glycine serine tyrosine domain  
 RAGE : Receptor for advanced glycation end-products  
 ras : rat sarcoma  
 RE : Réticulum endoplasmique  
 RGG : Arginine glycine glycine domain  
 RLRs : RIG-I-like receptor  
 RISC : RNA-induced silencing complex  
 RIP-1 : Receptor interacting serine/threonine protein kinase 1  
 rme-8 : Receptor mediated endocytosis -8  
 ROS : Reactive oxygen species  
 RRM : RNA Recognition motif  
 RRP4 : Ribosomal RNA processing -4  
 SAM : Sterile  $\alpha$  motif, ou Sterile  $\alpha$  and armadillo motif  
 Sarm1 : Sterile  $\alpha$  and TIR motif containing 1, ou Sterile  $\alpha$  and armadillo and TIR motif containing 1  
 SDN : small RNA degrading nuclease  
 SEK-1 : SAPK/ERK kinase -1  
 s.e.m : Standard error of mean  
 SERCA, : Sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase  
 SLA : Sclérose latérale amyotrophique  
 SMA2/3/4/9 : Small body size 2/3/4/9  
 SMN : Survival motor neuron protein  
 SOD1 : Superoxide dismutase -1  
 TAF-15 : TATA box binding associated factor -15  
 TARBP1/TARBP2 : Transactive response RNA-binding protein 1/ Transactive response RNA-binding protein 2  
 TDP-43 : Trans-active response DNA-binding protein de 43kDa.  
 TEP : Tomographie à émission de positrons  
 TIR : Toll/Interleukin-1 receptor  
 TLR : Toll-like receptor  
 TNFR : Tumor necrosis factor receptor

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor  $\alpha$   
TOL-1 : Toll family -1  
TREM2 : Triggering receptor expressed on myeloid cells 2  
TRPA1 : Transient receptor potential A1  
TSSa-RNAs : Transcription start site associated RNAs  
T-UCRs : Transcribed ultraconserved non-coding RNAs  
U.K. : United Kingdom  
UNC-13A : Uncoordinated protein -13 homolog A  
UTR : Untranslated region  
UPR : Unfolded protein response  
VCP : Valosin-containing protein  
VIH : Virus de l'immunodeficiency humaine  
wrn-1 : Human Werner's syndrome related -1  
XRN-1 /XRN-2 : 5'-3' exoribonuclease -1 / 5'-3' exoribonuclease -2  
ZFD : Zinc finger domain

## REMERCIEMENTS

Arriver jusqu'à l'aboutissement d'une thèse n'est pas un processus que l'on fait seul. Il est important de reconnaître et de remercier ceux sans qui cela n'aurait pas été possible. Je commencerais donc par ceux qui n'ont pas cru en moi, en mes capacités, ceux mêmes qui auraient pu me décourager par leurs paroles ou comportements et qui, finalement, m'ont rendu plus tenace.

Cette thèse n'aurait évidemment pas été possible sans le consentement et l'appui de mon directeur de thèse, Dr. Alex Parker, qui m'a laissé l'opportunité de faire ce que j'avais envie de faire tout en m'encadrant. Un grand merci.

Je souhaite remercier les membres du laboratoire, passés et présents. Dina et Carl parce qu'ils étaient là pour moi afin de m'intégrer à l'équipe à mes débuts. Et les membres actuels qui donnent une bonne ambiance et une bonne cohésion à l'équipe Parker : Sarah, Claudia, Kathrin, Audrey, James, Yasmin, et Gilles. Merci à vous.

A mes stagiaires, Lucresse, Mylène, Stephany, Constantin, qui m'ont permis d'avancer plus vite, qui m'ont appris la pédagogie et à qui j'espère avoir appris en retour.

Je tiens également à remercier l'équipe Vande Velde pour les échanges, les conseils, la bonne humeur. Sans oublier les autres scientifiques avec qui j'ai appris, Guillaume en microscopie, Prasamit ...

Merci aux membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.

Je profite de l'occasion pour remercier certains de mes amis proches, qui, en plus de m'apporter la joie de vivre, m'aident un peu chaque jour à me construire, qu'ils soient en Belgique, Audrey H., en France, Yoann B., Anne C., Thomas T., ou au Canada, Bernard N., Jonathan N., Pierre N., Sarah M., Marie-Hélène C-M., Yousra K., Chloe F. et j'en oublie sûrement : merci à vous.

Je souhaite remercier mon conjoint Stéphane, qui me supporte dans les bons comme dans les mauvais moments, qui croit en moi et fait de moi quelqu'un de meilleur. Au plus parfait des hommes : je t'aime. Et une pensée pleine d'amour à notre petit qui arrivera prochainement.

Je devais terminer par remercier mes parents puisqu'ils ont toujours été là et que tout ce que je suis, tout ce que je fais, c'est grâce à eux. Je vous aime.

Julie



*“Don't be trapped by dogma, which is living with the results of other people's thinking. Don't let the noise of other's opinions drown out your own inner voice. And most important, have the courage to follow your heart and intuition. They somehow already know what you truly want to become. Everything else is secondary.”*

- Steve Jobs, Discours à Stanford, 2015

# **I. Introduction**

D'après un rapport de l'organisation mondiale de la santé publié en 2006, environ 12% des décès constatés à travers le monde (en 2005 et selon les estimations, aussi en 2015) étaient dus à un désordre neurologique, dont 10% causés par un problème cérébro-vasculaire engendré par une maladie neurodégénérative sous-jacente<sup>a</sup>. Les maladies neurodégénératives sont, de fait, au cœur d'une majorité d'études et restent souvent incomprises et incurables. Le système nerveux est vu comme un ensemble fragile, sensible aux stress et préservé du système immunitaire. Pourtant, l'interface entre le système immunitaire et le système nerveux est un champ d'investigation non seulement très intéressant, mais aussi très fructueux. À l'aide d'idées émergentes dans d'autres domaines, nous avons tenté de comprendre des phénomènes que vraisemblablement les dogmes actuels ne suffisent plus à expliquer. La mécanistique à l'orée de la neurodégénérescence observée dans la maladie de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) sera l'objet de nos travaux. Nous décrirons dans un premier temps la SLA, puis nous mettrons en évidence l'implication du système immunitaire dans cette maladie et enfin, appuyés sur la diffusion d'un signal de la région lésée aux territoires nerveux plus lointains, nous traiterons du rôle des microARNs dans ce phénomène de propagation.

## **I.1.LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE**

### **I.1.1. Description et épidémiologie**

La sclérose latérale amyotrophique (ou SLA) est une maladie rare et complexe, aux manifestations variées, motrices la plupart du temps, mais pas uniquement. La SLA est une maladie chronique touchant le système nerveux central et périphérique. Les patients

---

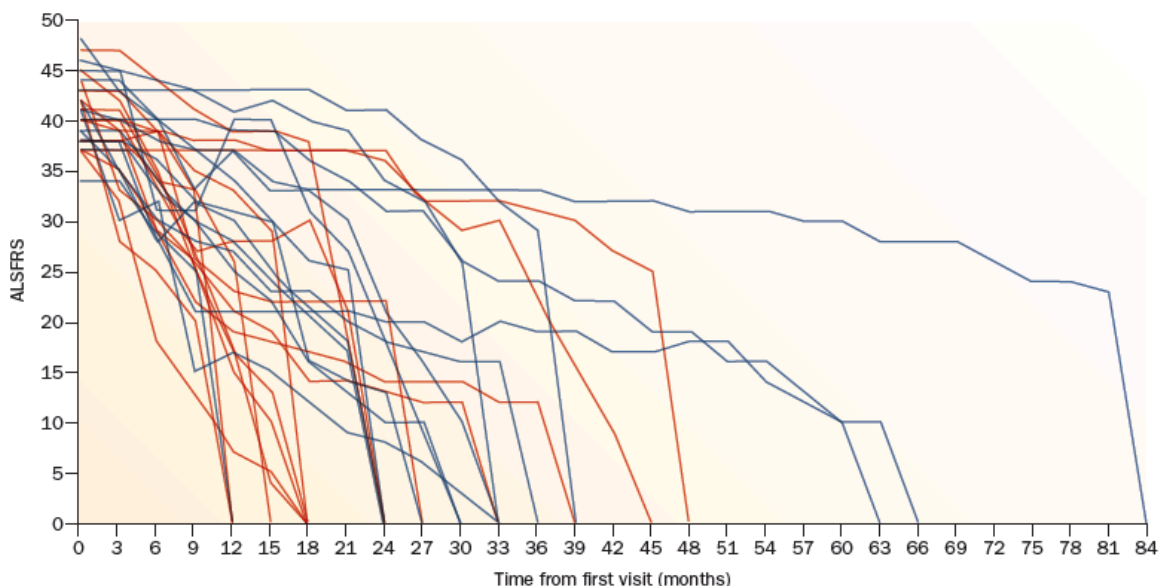
<sup>a</sup> D'après le livre *Neurological Disorders: Public Health Challenges* de la World Health Organization, 2006, chapitre 2. ISBN : 978 92 4 156336 9.

atteints ont en moyenne 55 à 60 ans, sans discrimination de sexe ni d'ethnie<sup>b</sup>. A partir du diagnostic de SLA, les patients vivent 3 à 5 ans, bien que 10% des patients vivent au delà de 10 ans. L'autopsie ne révèle aucun changement notable par rapport aux 90% autres [2-4]. Selon la région focale du système nerveux touchée en premier, nous parlerons de forme « spinale » - les membres sont affectés en premier – ou de forme « bulbaire », souvent plus agressive, affectant en priorité les muscles du visage (déglutition, phonation, mastication, etc). La symptomatologie et la progression de la maladie diffèrent beaucoup d'un patient à l'autre. Même dans un nombre de patients aussi petit que 30, la variabilité est clairement visible (Figure 1) (Pour revue : [3]).

La SLA est également nommée *maladie de Lou Gehrig*, en référence à un célèbre joueur de baseball atteint de la maladie à l'âge de 37 ans, ou encore *maladie de Charcot*, du nom du neurologue français Jean-Martin Charcot qui la décrivit en 1869. Cette maladie tient son nom de la dégénérescence de motoneurones établissant un tissu cicatriciel (Sclérose), de la partie latérale de la moelle-épineière dégénérant (Latérale) et de la fonte musculaire induite par la mort neuronale et la perte des jonctions neuromusculaires (Amyotrophique). Il est estimé que 90% des cas seraient « sporadiques », c'est-à-dire sans patrimoine génétique de prédilection, et 10% sont dits « familiaux ». Certains gènes mutés et responsables de la SLA ont été mis à jour ; ils seront détaillés par la suite.

---

<sup>b</sup> Des études épidémiologiques montrent qu'il existe quand même des différences d'incidence et de prévalence selon les régions du globe. L'île de Guam dans l'ouest du Pacifique ou la péninsule de Kii au Japon sont des régions à haute prévalence pour la SLA [1].



**Figure 1 : Variabilité de la progression de la maladie chez 30 patients différents pris au hasard.** Echelle d'évaluation fonctionnelle (ALSFRS, ALS Functional Rating Scale) des patients en fonction des mois passés après leur première visite. L'échelle d'évaluation fonctionnelle est basée sur 13 questions auxquelles les patients répondent telles que l'évaluation de la capacité à parler, avaler ou marcher. Les réponses donnent un score, 0 étant le pire (totale dépendance) et 40 le meilleur (parfaite santé). Les patients avec une forme bulbaire sont indiqués en rouge et ceux avec une forme spinale en bleu. D'après Swinnen et Robberecht, 2014 [3].

### I.1.2. Les formes sporadiques

L'avènement des formes sporadiques est dû au vieillissement du système nerveux, à des facteurs génétiques et environnementaux, bien que les principales causes restent à élucider. L'évolution des formes sporadiques et familiales est similaire, mais ces dernières semblent survenir 10 ans plus tôt. Les facteurs environnementaux à risque sont principalement le tabagisme, qui augmente le risque de développer la maladie jeune, mais ne change en rien la progression ou l'intensité de la pathologie [5], et l'exposition à certains composés chimiques comme le formaldéhyde ou les métaux lourds (bien que les études soient assez contradictoires) [5,6] (Pour revue : [7]). Les athlètes de haut niveau, à l'instar de Lou Gehrig, sembleraient être plus à risque de développer la SLA, mais une étude a

montré qu'une grande activité physique n'est pas un facteur de risque. La corrélation entre les athlètes et le risque accru serait due à un certain profil génétique [5](Pour revues : [7,8]). D'une manière générale, les traumatismes répétés à la tête, mais non aux autres parties du corps – comme ceux qu'occasionnent des sports de contact telle que la boxe – sont des facteurs de risques de développer la SLA [9]. Les avis quant aux facteurs tels que les cyanobactéries et les champs électromagnétiques/champs électriques sont assez controversés [7]. Enfin, le contact avec les pesticides serait pour le développement de la SLA, comme d'autres maladies neurodégénératives, également un facteur à risque [7].

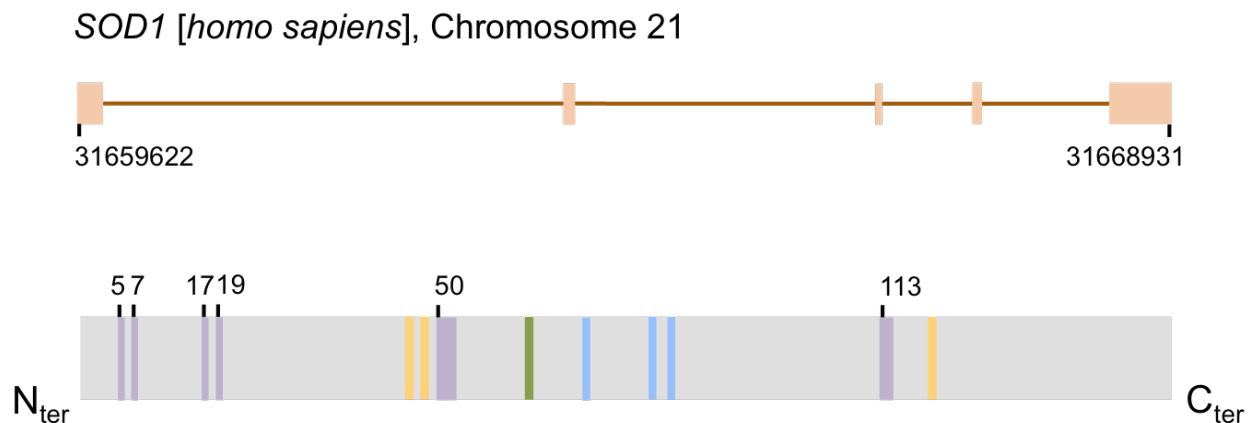
### **I.1.3. Les formes familiales**

Avec la découverte d'une mutation associée à la SLA familiale dans le gène *SOD1* en 1993 [10], les recherches associant cette maladie et des mutations géniques se sont multipliées, menant à 38 le nombre de gènes impliqués dans la SLA connus à l'heure actuelle, bien que certains restent encore à confirmer. Nous détaillerons dans les paragraphes suivants certains de ces gènes, leurs caractéristiques et leurs rôles dans la pathologie.

#### *I.1.3.1. SOD1*

*SOD1* (Figure 2) est une enzyme qui catalyse la conversion de l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet -}$  en peroxyde d'hydrogène. Ce mécanisme protecteur empêche l'accumulation de radicaux libres, et ainsi d'infliger des dommages, notamment à l'ADN. Un lien a été découvert entre une mutation (substitution) dans le gène *SOD1* et la SLA familiale en 1993 [10]. La même année, l'analyse de cerveaux de patients (10 individus sains, 4 ayant la SLA familiale dont 3 ayant une mutation dans *SOD1* et 11 cas sporadiques) a montré une activité réduite de l'enzyme *SOD1* dans les cas héréditaires, qu'il y ait ou non mutation dans *SOD1*, ainsi que des dommages oxydatifs dans les cas sporadiques [11]. La protéine mutante *SOD1* est non seulement déficitaire dans sa fonction, mais inhibe également les protéines normales formées par l'allèle sain. *SOD1* est le gène le plus étudié grâce aux nombreux modèles animaux, que ce soit chez le porc, la souris, le poisson zèbre, la drosophile ou encore le

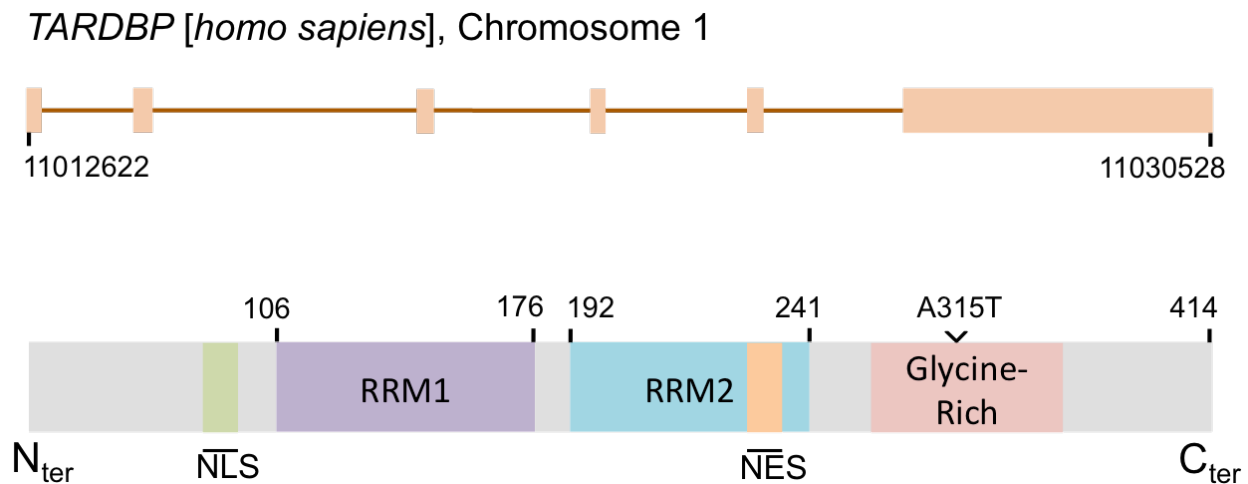
nématode *C. elegans* [12-16]. Les mutations les plus communes affectant l'activité de cette enzyme sont D90A, A4V et G93A. L'augmentation de radicaux libres générée cause une dégradation nucléaire et mitochondriale [17] (Pour revue : [18]). La protéine mutée SOD1, qui se retrouve mal repliée, serait responsable de l'excitotoxicité [19,20], du stress du réticulum endoplasmique [21], de l'inhibition du protéasome [22,23], d'un transport axonal altéré [24,25], d'un déficit des vésicules synaptiques [26] et d'une perte des jonctions serrées [27]. Enfin, la mutation dans SOD1 entraînerait une toxicité extracellulaire de la protéine relâchée par les cellules (gain de fonction toxique et non perte de fonction de la protéine), d'une manière similaire aux prions (Pour revue : [28]).



**Figure 2 : Structure primaire du gène *SOD1* et de sa protéine.** (Haut), gène humain *SOD1* composé de 5 exons (rectangles). (Bas), protéine humaine *SOD1* de 154 acides-aminés. En violet les domaines d'interaction protéique, en jaune les domaines d'interaction avec le cuivre, en bleu les domaines d'interaction avec le zinc, en vert le domaine d'interaction avec le cuivre et le zinc. Les numéros correspondent au numéro de l'acide-aminé sur les 154 indiquant le début des domaines d'interaction protéique.

### I.1.3.2. TDP-43

La protéine TDP-43 (Trans-active response DNA binding protein) de 43kDa a été initialement découverte pour son rôle dans la répression de la transcription du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) [29]. En 2006, des agrégats de TDP-43 ont été trouvés dans des cas de patients atteints de SLA ou de démences fronto-temporales (DFT) [30]. Plusieurs mutations sur le gène *tardbp*, composé de 6 exons et codant pour TDP-43, ont été décelées, la plupart étant dans le domaine riche en glycine (Figure 3). TDP-43 est également composée de deux domaines de reconnaissance des ARNs (RRM, RNA recognition motif), d'un signal de localisation au noyau (NLS, nuclear localization signal) et d'un signal d'exportation du noyau (NES, nuclear export signal) (Figure 3).



**Figure 3 : Structure primaire du gène *TARDBP* et de sa protéine TDP-43.** (Haut), gène humain *TARDBP* composé de 6 exons (rectangles). (Bas), protéine humaine TDP-43 de 414 acides-aminés. NLS, nuclear localization signal ; RRM, RNA recognition motif ; NES, nuclear export signal ; Glycine-rich, domaine riche en glycine ; N<sub>ter</sub>, région terminale NH<sub>3</sub> ; C<sub>ter</sub>, région terminale COOH. Les numéros correspondent au numéro de l'acide-aminé sur les 414. La position de la mutation A315T a été représentée.

TDP-43 est exprimée de manière ubiquitaire. En conditions physiologiques la protéine se trouve dans le noyau, mais dans les cas de DFT ou de SLA on retrouve celle-ci dans le cytoplasme des cellules sous forme d'agrégats, qui ne permettent aucunement de prédire la progression de la maladie [31]. Dans 97% des cas de SLA des agrégats de TDP-43 se forment, alors que le gène n'est muté que dans environ 5% des cas de SLA familiale. Il est à noter que l'élimination des agrégats de TDP-43 ne réduit pas la cytotoxicité [32]. TDP-43 est une protéine liant l'ADN et l'ARN, impliquée dans différents processus métaboliques incluant :

- la transcription de l'ADN

Lors d'études sur la régulation de l'expression de gènes du VIH par l'équipe du Dr. Ou en 1995, la protéine TDP-43 a été découverte se liant à l'ADN double brin afin de réprimer la transcription de gènes spécifiques [29]. De plus, un immunomarquage de TDP-43 montre une localisation de la protéine aux sites de transcriptions dans des neurones sains de rat [33]. Il semblerait donc que TDP-43 soit impliquée dans la transcription de l'ADN.

- l'épissage d'ARNs pré-messagers

TDP-43 est capable de se lier aux séquences (TG)<sub>m</sub> de l'exon 9 d'une protéine régulatrice de la conductance transmembranaire dans la fibrose kystique (CFTR) et effectuer son épissage [34]. Il apparaît que la protéine TDP-43 se lie principalement à des régions introniques et à des ARNs longs non codants [35]. Par exemple, une liaison directe avec l'intron 8 du gène CFTR a été observée [36]. De plus, TDP-43 semble se fixer aux ARNs pré-messagers, procédant à un épissage alternatif et formant différents isoformes d'ARNs messagers (ARNm) et principalement des ARNs codant pour des protéines impliquées dans le développement neuronal [35].

- la stabilité des ARNs messagers

La protéine TDP-43 se lie en effet à la région 3'UTR (3' untranslated region) des ARNm [35]. Une approche protéomique globale a permis de montrer que TDP-43 interagit avec des protéines régulatrices du métabolisme de l'ARN et en particulier celles jouant un rôle –



comme nous venons de le voir – dans l'épissage, dans la traduction au niveau du cytoplasme et au niveau du transport d'ARNs et de leur stabilité [37].

#### - la biogénèse des microARNs (miRNAs)

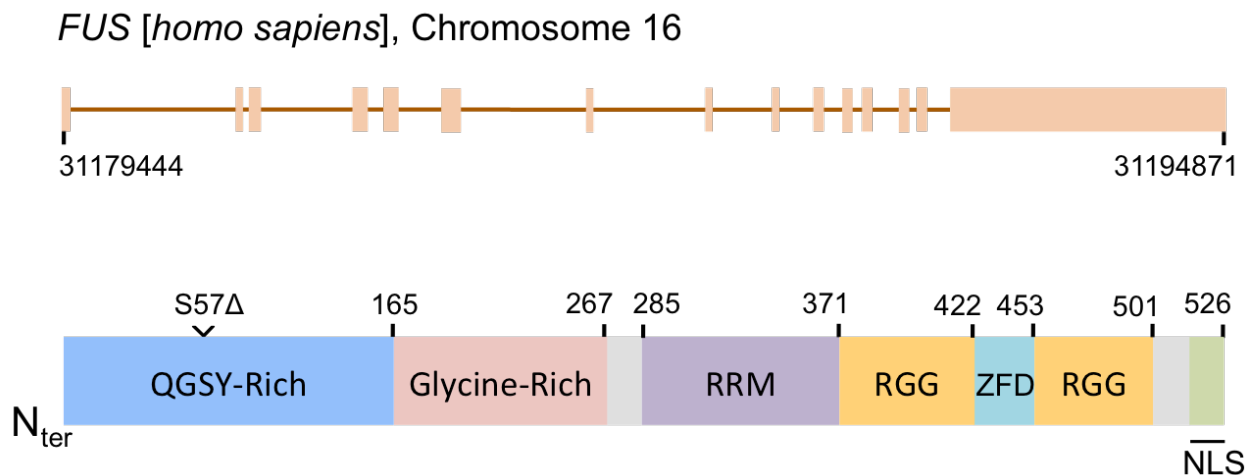
Une étude des Dr. Kawahara et Mieda-Sato sur trois lignées cellulaires différentes (à savoir la lignée neuronale humaine SH-SY5Y, la lignée humaine HeLa et la lignée neuronale murine Neuro2A) a montré que TDP-43 lie des pri-miRNAs spécifiques dans le noyau ainsi que la boucle de pré-miRNAs dans le cytoplasme [38]. De plus, une répression du gène codant pour TDP-43 mène à une sous-expression d'une dizaine de miRNAs indépendamment de la lignée cellulaire ou de l'espèce. TDP-43 interagit directement avec les protéines Dicer et Drosha, toutes deux enrôlées dans la maturation des miARNs et dont le processus détaillé sera expliqué par la suite [38].

#### - le recrutement aux granules de stress

Le stress cellulaire est une composante attendue dans un cas pathologique comme la SLA. La formation de granules de stress survient en réponse à un tel stress. Il a par exemple été montré grâce à une élégante approche utilisant la luciférase, qu'un stress cellulaire osmotique/oxydatif (induit par le sorbitol) induisait une oligomérisation de TDP-43 (non mutée) [39]. La fonction même des granules de stress est encore matière à débat et dépendamment des molécules séquestrées au sein de ces granules, on peut considérer qu'ils ont un effet protecteur ou néfaste pour la cellule. La présence de TDP-43 au sein des granules de stress n'est pas indispensable à leur maintien structurel, mais en revanche une déplétion de cette protéine affecte leur formation, altère leur assemblage ou agrégation secondaire, accélère leur désassemblage, et les protéines recrutées au sein de ces granules peuvent différer [40]. Enfin, une mutation du gène codant pour TDP-43 a des conséquences sur le rôle que joue TDP-43 aux granules de stress. Entre autres, le nombre et la taille de ces granules par cellules augmente [41].

#### I.1.3.3. *FUS/TLS*

La protéine fused in sarcoma (FUS) (encore nommée FUS/TLS pour translocated in sarcoma) a d'abord été découverte comme une oncoprotéine chimérique impliquée dans le liposarcome myxoïde [42], puis fut associée à la SLA en 2009 [43,44]. C'est une protéine ubiquitaire, exprimée principalement dans le noyau et engagée comme navette nucléoplasmique. À plus d'un point de vue, la structure et la fonction de FUS fait écho à la protéine TDP-43 (Figure 3, Figure 4). FUS possède un domaine riche en glycine et un domaine « prion-like » ou encore riche en glutamine-glycine-serine-tyrosine (QGSY). Elle possède également un domaine de reconnaissance des ARNs (RRM, RNA recognition motif), deux domaines riches en arginine-glycine-glycine (RGG), un domaine en doigt de zinc (ZFD, zinc finger domain) et un signal de localisation nucléaire (NLS, nuclear localization signal) (Figure 4).



**Figure 4 : Structure primaire du gène *FUS* et de sa protéine.** (Haut), gène humain *FUS* composé de 15 exons (rectangles). (Bas), protéine humaine FUS de 526 acides-aminés. QGSY-rich, domaine riche en glutamine-glycine-serine-tyrosine ; Glycine-rich, domaine riche en glycine ; RRM, RNA recognition motif ; RGG, domaine riche en Arginine-glycine-glycine ; ZFD, Zinc finger domain, NLS, nuclear localization signal ; N<sub>ter</sub>, région terminale NH<sub>3</sub> ; C<sub>ter</sub>, région terminale COOH. Les numéros correspondent au numéro de l'acide-aminé sur les 526. La position de la mutation S57Δ a été représentée.

Quant à sa fonction et succinctement, FUS lie directement l'ADN simple brin ou double brin aux sites endommagés [45] et principalement au niveau de G-quadruplexe, des structures secondaires présentes surtout aux télomères et aux promoteurs, incitant à penser que FUS joue un rôle dans la transcription et dans la stabilité du génome [46-48]. De plus, et au même titre que TDP-43, FUS se lie aux ARNs, surtout sur les longs introns [49,50] et de préférence à certains motifs riches en GU [50,51]. Elle aurait un rôle dans le transport et la traduction locale d'ARNm [52,53]. Enfin, FUS est recrutée aux granules de stress en conditions de stress et lorsque le gène *FUS* est muté (Pour revue : [54]).

Néanmoins, il existe des divergences entre TDP-43 et FUS. Entre autres, les cibles d'ARNs pré-messagers, ainsi que la position de liaisons aux longs ARNs non-codants (lncRNAs) [50] :

---

*We also identified 843 FUS/TLS-binding sites on 71 of 234 literature-curated lncRNAs. Two-thirds (66%) of these contained the FUS/TLS motif GUGGU. Similarly to what we observed for the protein-coding RNA targets, the position of FUS/TLS-binding sites on lncRNAs were distinct from those of TDP-43 (...) [50]*

---

---

*In contrast with the increased number of TDP-43-binding sites previously observed in the 3' UTR of genes, such as progranulin (*Grn*), that are upregulated after TDP-43 reduction<sup>15</sup>, no similar enrichment in FUS/TLS binding was seen in the 3' UTR of upregulated FUS/TLS targets, consistent with the recent proposal that FUS/TLS does not affect the steady-state levels of mRNAs once they reach the cytoplasm. [50]*

---

#### *I.1.3.4. C9ORF72*

Découvert par deux équipes simultanément en 2011, une expansion non codante des nucléotides GGGGCC dans le premier intron du gène *C9ORF72* (Chromosome 9 open reading frame 72) [55,56], est retrouvée chez environ 40% des patients ayant une SLA familiale. La pathogénicité du nombre de répétitions n'est pas clairement définie, bien que certains chercheurs s'entendent à dire que moins de 30 répétitions GGGGCC seraient physiologiques – quoique 2 études montrent une pathogénicité à 22 unités GGGGCC [57,58] – tandis que les patients ayant développé une SLA peuvent atteindre plus de 1000 répétitions. Là encore, il

existe une variabilité entre les tissus observés, sachant qu'à *priori* les cellules neuronales exhiberaient plus de répétitions que les cellules non neuronales chez un même patient [59,60]. Cependant, par les techniques actuelles il est difficile de quantifier cette expansion. Néanmoins, nous savons qu'il existe 3 transcrits épissés alternativement et 2 protéines formées de 481 a.a. et 222 a.a. Par bioinformatique, il a été noté que la séquence partage des caractéristiques avec la protéine DENN (Differentially expressed in normal and neoplastic cells) [61,62]. La protéine DENN est une protéine GEF (Guanine nucleotide exchange factor) impliquée dans le trafic intracellulaire et l'endocytose [63]. De plus, la répétition GGGGCC elle-même semble altérer l'export nucléaire d'ARNs, suggérant un rôle à la membrane nucléaire [64,65].

Malgré cela, un voile persiste quant à l'expression, à la fonction et à la pathogénicité du gène *C9ORF72*. Une nouvelle piste vient néanmoins d'être avancée (en mars 2016) par O'Rourke *et al.* mettant en lumière une connexion entre le gène *C9ORF72* et les fonctions immunitaires [66]. En effet les souris « knock-out » homozygotes ou hétérozygotes (*C9ORF72*<sup>-/-</sup> ou *C9ORF72*<sup>+/-</sup> respectivement) exhibent un phénotype macroscopique et physiologique « normal », sans atteintes motrices notables, même à un stade avancé (17 mois). Cependant, une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, Interleukin-1β ; IL-10, Interleukin-10 ; IL-6, Interleukin-6) et du récepteur exprimé à la surface des macrophages/monocytes TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) est observée. D'une manière générale, le gène *C9ORF72* est exprimé environ 15 fois plus dans les macrophages que dans les lymphocytes B ou T. En terme de fonction, la quantification de 35 gènes co-exprimés avec *C9ORF72*, montre que seuls les gènes de la voie lysosomale sont sur-exprimés. Cette implication dans le trafic lysosomal a été vérifiée grâce à des marqueurs fluorescents. Fait plus intéressant encore, les souris *C9ORF72*<sup>+/-</sup> et *C9ORF72*<sup>-/-</sup> montrent une production accrue de cytokines en réponse à une activation des TLR1 et TLR2 par le Pam3CSK4, des TLR2 et TLR4 par des peptidoglycanes et du TLR9 par le CpG. En comparant les voies altérées chez les souris *C9ORF72*<sup>-/-</sup>, les auteurs ont constaté que le tiers est relatif à l'inflammation, dont la quasi totalité a été confirmée chez des patients ayant la SLA [66]. Cette remarquable étude a été réalisée sur des souris déficientes pour le gène *C9ORF72*, sans considération quant à l'expansion de GGGGCC observée chez les patients, mais nous pouvons émettre l'hypothèse que la réponse inflammatoire est

également sur-activée chez les patients ayant une répétition dans le gène *C9ORF72* et ayant développé une SLA. En parallèle à cette étude, une autre publication a été menée, venant supporter le rôle de *C9ORF72* dans le système immunitaire. En effet, des souris déficientes pour ce gène ont une dérégulation immunitaire, à savoir une expansion et une activation des cellules immunitaires, un nombre d'anticorps élevé et une glomérulonephropathie causée par la dérégulation immunitaire, le tout faisant penser à une réaction auto-immune type lupus [67].

#### *I.1.3.5. Autres gènes en cause*

Outre les gènes *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* et *C9ORF72*, 34 autres gènes ont été découverts reliés à la SLA, certains d'entre eux ont été déterminés comme causatifs alors que les auteurs ont simplement trouvé un variant allélique présent chez un ou quelques patients ayant la SLA et étant absent des patients sains (Tableau 1). En regardant l'ensemble de ces gènes et leur fonction (réduite à un type dans le tableau, mais qui parfois est plus diversifiée), il est possible de les regrouper en catégories. Les gènes dont les protéines sont impliquées dans le métabolisme des ARNs et le transport vésiculaire sont les plus nombreux. Néanmoins, nous retrouvons également des gènes codant des protéines du cytosquelette ou enrôlées dans sa dynamique - par exemple les protéines aux abords des granules de stress sont entre autres TDP-43, *FUS*, *VCP* (Valosin-containing protein), *SMN* (Survival motor neuron protein), *TAF-15* (TATA-box binding protein associated factor -15), *ANG* (Angiogenin) et la profiline-1 (Pour revue : [68]) - des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'autophagie, dans le métabolisme cellulaire d'une manière générale ou encore dans les gènes immunitaires, tels que *Sarm1* (sterile  $\alpha$  and TIR motif-containing 1) et *à priori C9ORF72*. Quelques gènes ont une fonction inconnue : c'est le cas de *ALS3* et *ALS7*.

Fonction	Gene	Protéine associée	Cas de SLA	Découverte
	<b>Etat établi</b>			
Métabolisme des ARNs	ANG, ALS9	Angiogenine	15 individus (4 SLAf, 11SLAs) sur un panel de 1629 patients	1
	ATXN2, ALS13	Ataxine-2	13 cas à plus de 30 répétitions sur un panel de 1294 cas de SLA	2
	ARHGEF28	Rho guanine nucleotide exchange factor 28	1 cas rapporté puis 2 cas sur 382 cas de SLA	3,4
	FUS, ALS6	Fused in sarcoma, FUS	≈3-5% des SLAf, ≈1% des SLAs	5,6
	MATR3, ALS21	Matrine-3	1.8% des cas de SLAs sur 164 patients sporadiques	7
	TARDBP	Tar DNA binding protein de 43kDa, TDP-43	≈4% des SLAf, ≈1% des SLAs	8
	SETX, ALS4	Senataxine	1 cas de SLAs sur une cohorte de 45	9
	ERBB4, ALS19	Erb-B2 receptor tyrosine kinase 4, ERBB4	3 cas recensés	10
	ALSIN, ALS2	Alsine	50 cas rapportés	11
	CHMP2B, ALS17	Chromatin modifying protein 2B, CHMP2B	2 cas rapportés puis 4 cas sur 433 patients ayant la SLA	12,13
Transport vésiculaire	FIG4, ALS11	Factor induced gene 4, FIG4	9 cas sur 473 patients ayant la SLA	14
	OPTN, ALS12	Optineurine	<1% des cas de SLA	15
	SIGMAR1, ALS16	σ non opioïd intracellulaire receptor 1, SGMR1	Rare	16
	SPG11, ALS5	Spatacine	2 individus dans une famille	17,18
	VAPB, ALS8	Vesicle associated membrane protein, VAPB	7 familles brésiliennes recensées	19
	VCP, ALS14	Valosin-containing protein, VCP	1.5% des cas de SLAf	20,21
	DCTN1	Dynactine 1	Quelques cas rapportés	22
	MAPT	Microtubule-associated protein Tau	<inconnu>	23
	PFN1, ALS18	Profiline 1	≈1% des cas de SLAf	24,25
	SQSTM1	SQSTM	2-3% des cas de SLA	26,27
Auto-phagie	UBQLN2, ALS15	Ubiquiline 2	Rare	28
Métabolisme cellulaire	CHCHD10	Coiled coil helix coiled coil domain containing 10	8 cas de SLA	28
	NIPA1	Magnesium transporter NIPA1	5% des cas sur une cohorte de 2292 patients	30,31
Métabolisme	PGRN	Progranuline	Rare	32
	SOD1, ALS1	Superoxyde dismutase, SOD1	≈20% des SLAf, ≈1-2% des SLAs	33
Im-mu-nité	C9ORF72	Fonctions immunitaires microgliales	≈40% des SLAf	34,35
In-connu	ALS3	<inconnu>	Plusieurs individus dans une famille	36
	ALS7	<inconnu>	1 cas sur 16 familles SLA étudiées	37
	<b>Etat à confirmer</b>			
Métabolisme des ARNs	EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1	2 cas sur 817 de SLA	38
	hnRNPA1, ALS20	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Rare	39,40
	hnRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Rare	39,40
	TAF15	TATA box binding protein associated factor, TAF15	< de 10 cas de SLA	41
	NEFH	Neurofilament heavy polypeptide, NFH	5 cas de SLA	42
Cyto-squelette	TUBA4A	Tubuline α4A	4 cas sur une cohorte de 272 SLAf	43
Im-mu-nité	SARM1	Sterile alpha and TIR motif containing 1, SAMR1	≈12% des cas de SLA	44
	TBK-1	TANK-Binding Kinase 1, TBK1	<0,5% des cas de SLA	45
Autre	DAO	D-amino acid oxidase, OXDA	1 famille rapportée	46
	<b>Etat incertain</b>			
Cyto-squelette	PRPH	Périphérine	1 cas de SLAs	47

**Tableau 1 : Gènes associés à la SLA, protéine associée et fonction, et nombre de cas répertoriés.** SLAs, SLA sporadique ; SLAf, SLA familiale. *Références :* 1, Greenway, 2006 [69] ; 2, Lee, 2011 [70] ; 3, Droppelmann, 2013 [71] ; 4, Ma, 2014 [72] ; 5, Kwiatkowski, 2009 [43] ; 6, Vance, 2009 [44] ; 7, Johnson, 2014 [73] ; 8, Neumann, 2006 [30] ; 9, Zhao, 2009 [74] ; 10, Takahashi, 2013 [75] ; 11, Hadano, 2001 [76] ; 12, Parkinson, 2006 [77] ; 13, Cox, 2010 [78] ; 14, Chow, 2009 [79] ; 15, Maruyama, 2010 [80] ; 16, Al-Saif, 2011 [81] ; 17, Orlacchio, 2010 [82] ; 18, Daoud, 2012 [83] ; 19, Nishimura, 2004 [84] ; 20, Johnson, 2010 [85] ; 21, Gonzalez-Perez, 2012 [86] ; 22, Münch, 2004 [87] ; 23, Hutton, 1998 [88] ; 24, Wu,

2012 [89] ; 25, Chen, 2013 [90] ; 26, Fecto, 2011 [91] ; 27, Le Ber, 2013 [92] ; 28, Deng, 2011 [93] ; 29, Bannwarth, 2014 [94], 30, Blauw, 2010 [95] ; 31, Blauw, 2012 [96] ; 32, Talbot, 2006 [97] ; 33, Rosen , 1993 [10] ; 34, DeJesus-Hernandez, 2011 [55] ; 35, O'Rourke, 2016 [66] ; 36, Hand, 2002 [98] ; 37, Sapp, 2003 [99] ; 38, Couthouis, 2012 [100] ; 39, Kim, 2013 [101] ; 40, Le Ber, 2014 [102] ; 41, Couthouis, 2011 [103] ; 42, Figlewicz, 1994 [104] ; 43, Smith, 2014 [105] ; 44, Fogh, 2014 [106] ; 45, Cirulli, 2015 [107] ; 46, Mitchell, 2010 [108] ; 47, Corrado, 2011 [109].

---

#### **I.1.4. Les perturbations métaboliques**

Bien que deux formes existent dans la SLA, les mécanismes cellulaires et moléculaires menant à la mort neuronale semblent être identiques. Au niveau métabolique, plusieurs points sont à noter.

De manière non-exhaustive, nous pouvons retrouver un certain nombre de perturbations telles qu'une excitotoxicité due au glutamate et une hyperpolarisation membranaire, un stress oxydatif et un stress du réticulum endoplasmique, un déficit énergétique, des anomalies structurelles et fonctionnelles mitochondriales, une dérégulation calcique, etc.

##### Excitotoxicité au glutamate et hyperpolarisation membranaire

Concernant ces deux derniers points, la seule médication contre la SLA actuellement sur le marché, le riluzole, (qui dans le meilleur des cas prolonge de quelques mois l'espérance de vie) entrave la libération de glutamate par les cellules. Les dommages neuronaux peuvent être induits par une excitotoxicité due à un excès de glutamate, suite à une activation répétée des récepteurs AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate). Or, une réduction du transport du glutamate a été notée dans les synaptosomes de tissu nerveux de patients ayant la SLA [110] et une baisse de la quantité de la protéine membranaire EAAT2 (Excitatory amino-acid transporter 2) qui récupère le glutamate du milieu extracellulaire au niveau synaptique a été observée [111]. Pour finir, une élévation du niveau de glutamate du liquide céphalorachidien et du plasma d'environ

40% de patients ayant une SLA a été décrit, bien que cela ne semble pas être le facteur déclenchant de la mort neuronale [112,113].

### Stress oxydatifs

Un autre changement notable dans les cas de SLA sont les dommages oxydatifs de protéines, de lipides et de l'ADN/l'ARN. Par exemple, le niveau de peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres augmentent chez des modèles murins SOD1 de SLA, *in vitro* et *in vivo* [114]. De même le niveau de nitrotyrosine (un marqueur de dommages oxydatifs) dans la moelle-épineuse et plus précisément les motoneurones de souris est augmenté [115]. Les lipides sont peroxydés [116], l'ADN oxydé et les ARNm-polyA également (étude *post-mortem*) [117]. Il semblerait même que certaines espèces d'ARNm seraient plus sensibles à l'oxydation, telles que celles dont les protéines serviraient au transport d'électrons dans la chaîne mitochondriale, dans la myélinisation des axones, dans le métabolisme cellulaire et protéique, dans le cytosquelette, etc. La plupart du temps un ARNm oxydé perd sa capacité à être traduit en protéine [118].

### Problèmes mitochondriaux

Les mitochondries sont des organelles nécessaires et indispensables à la survie cellulaire, entre autres par leur rôle dans la respiration. Il a été noté un certain nombre de déficits mitochondriaux chez les patients ayant la SLA ou encore dans les modèles de SLA. Morphologiquement, les mitochondries paraissent anormales et enflées, et peuvent contenir la protéine mutée SOD1 [119-121]. Une augmentation du volume mitochondrial, dans les axones ou les corps cellulaires, corrélée *in vivo* avec la présence de la protéine SOD1 mal-repliée, ainsi qu'en présence d'une conformation toxique de la protéine BCL-2 (B-cell lymphoma 2) et d'une production de superoxyde a été observée [122,123]. La chaîne de transport des électrons est diminuée [124,125], l'importation de protéines ainsi que le tamponnage calcique sont dérégulés [126-128], la conductance de certains canaux ioniques diminue [129], sont d'autant d'observations faites à l'échelle mitochondriale et reflétant ce qui se passe à l'échelle cellulaire.



### Stress du Réticulum endoplasmique (RE)

Le réticulum endoplasmique (RE) est le compartiment cellulaire responsable de la synthèse protéique, des processus post-traductionnels, des repliements tridimensionnels adéquats, et potentiellement de l'export cellulaire des protéines néo-synthétisées *via* l'appareil de Golgi. Un dysfonctionnement du système peut entraîner des protéines mal-repliées et une réponse aux protéines mal-formées (UPR, *unfolded protein response*). En cas de déficit de cette réponse, il peut se produire une mort cellulaire programmée (Pour revue : [130]). Dans les cas de SLA, il a été observé un stress du RE, notamment dans les motoneurones, menant à l'apparition de protéines mal-formées néfastes pour la cellule et une diminution de la réponse UPR. Une des résultantes est, entre autres, une augmentation de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*), accroissant le stress oxydatif (Pour revue : [131]). De même, précédemment dans notre laboratoire a été démontré que les protéines humaines mutées TDP-43 et FUS chez le ver *C. elegans* activent la réponse UPR et génèrent un stress oxydatif ayant un effet délétère sur les neurones et la survie du ver [132]. L'inhibition pharmacologique du stress du RE et de la réponse UPR protège contre la protéotoxicité due à TDP-43 chez le ver mais aussi chez le poisson zèbre [133].

### Déficit énergétique

Chez les patients ayant la SLA, on observe une perte de poids, souvent associée à la fonte musculaire, mais pas seulement. Il existe un hyper-métabolisme et une augmentation de la lipolyse chez ces patients [134-136]. Les raisons de ces dysfonctions ne sont actuellement pas claires, néanmoins, l'augmentation de la demande en oxygène par les muscles et les déficits mitochondriaux pourraient être un indice. De plus, une corrélation évidente entre l'état d'hyper-métabolisme et la progression de la maladie a été observée [137]. Il est à noter une altération dans la chaîne de transport d'électrons, une résistance insulinique et une intolérance au glucose, une concentration plasmatique de lipides plus élevée et une hyperlipidémie [136,138,139]. Dans les modèles animaux, les mêmes constatations ont été faites ; entre autres : une perte de poids notable chez les souris G93A et G86R comparées aux souris saines alors que leur prise de nourriture est identique, une thermorégulation abaissée, une augmentation de la lipolyse et un hyper-métabolisme des

muscles squelettiques. Corroborant ces résultats, une diète riche en lipides améliore le métabolisme et permet un recul de l'apparition des symptômes [140]. Enfin, le croisement de souches de souris SLA G93A ou G86R avec des souris déficientes pour un gène impliqué dans le métabolisme énergétique permet une augmentation de la survie de la souris et/ou une variation du début des symptômes. De même, l'utilisation d'une thérapeutique métabolique (restriction calorique, addition de pyruvate ou d'autres molécules modifiant le métabolisme) fait varier la symptomatologie de la SLA chez les souris (Pour revue : [141]).

### Dérégulation calcique

Etant donné les aberrations mitochondriales et du RE, deux lieux de stockage calcique, il était attendu à ce que nous retrouvions une dérégulation de l'homéostasie calcique dans les cas de SLA. En outre, des enregistrements utilisant la technique du « patch-clamp » sur des coupes de tissu et des mesures calciques micro-fluorométriques ont montré que le tamponnage calcique était 5 à 6 fois supérieur dans les neurones oculomoteurs – non touchés par la SLA – que dans des neurones de l'hypoglosse ou de la moelle-épinière, plus sensibles et donc vulnérables à la SLA [142]. Venant supporter ces résultats, une autre étude en 2008 propose qu'un faible tamponnage calcique intracellulaire est un facteur à risque de dégénérescence chez des modèles de souris SOD1 [143].

Précédemment, dans notre laboratoire, nous avons étudié ce phénomène dans des modèles de SLA chez le nématode *C. elegans* exprimant la protéine humaine TDP-43 mutée (TDP-43<sup>A315T</sup>). Le croisement de cette souche transgénique avec des vers déficients pour des protéines clés de la régulation calcique – à savoir la calréticuline (CRT-1), un régulateur calcique du RE ; la calnexine (CNX-1), une protéine fixant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ; le récepteur à la ryanodine (UNC-68), un canal qui expulse le calcium du RE dans le cytoplasme et le récepteur à l'inositol 1,4,5 triphosphate (ITR-1) qui a la même action – fait drastiquement diminuer la toxicité induite par TDP-43<sup>A315T</sup> [144] (Annexe 1). La même observation a été faite en utilisant des outils pharmacologiques tels que l'EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), un chélateur calcique, le dantrolène inhibant le récepteur à la ryanodine, et la thapsigargine permettant la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$ . Il est connu qu'une hausse du calcium cytoplasmique est cytotoxique et active la voie des caspases menant à l'apoptose. Nous

avons voulu savoir si la dégénérescence observée dans nos modèles était apoptotique. Pour cela, nous avons utilisé des vers déficients pour les protéases calpaïne (TRA-3) – qui par ailleurs est à niveau élevé dans la moelle-épinière de patients ayant la SLA [145] - et aspartyl (ASP-4), qui toutes deux participent à la mort nécrotique cellulaire. Il a également été trouvé que l'absence de ces protéases diminuait la paralysie et la neurodégénérescence induites par TDP-43<sup>A315T</sup>. Afin de corroborer ces résultats, nous avons utilisé un mutant pour la caspase 3 (CED-3) et n'avons pas observé de changement de toxicité. Ainsi la mort cellulaire dans nos modèles de SLA serait de profil nécrotique ; nous y reviendrons dans la section dédiée à Sarm1.

Si la dérégulation calcique intracellulaire engendrée par un déficit des organelles qui stockent le calcium joue un rôle majeur dans la neurodégénérescence, la variabilité induite par une faille de la membrane cytoplasmique peut avoir les mêmes effets néfastes. C'est par exemple ce que propose une étude sur les canaux calcium voltage-dépendants qui modulent l'entrée de calcium dans les neurones en réponse à une dépolarisation membranaire. Il semblerait que ces canaux soient présents en plus forte quantité dans les neurones corticaux de modèles de souris SOD1<sup>G93A</sup> ainsi que dans le cortex moteur, comparativement à des souris saines. Ainsi, une plus grande pénétrance de calcium pourrait aussi induire des dommages tissulaires importants [146].

#### **I.1.5. Modèles de sclérose latérale amyotrophique chez *C. elegans***

Différents modèles de SLA ont été créés afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à la neurodégénérescence. Par exemple, il existe des modèles de déplétion ou de suppression de TDP-43 ou de ses homologues. Ainsi nous savons que TDP-43 chez la souris est vitale puisqu'une mutation homozygote dans son gène causant une protéine dysfonctionnelle entraîne une mortalité précoce. Cette protéine joue un rôle fondamental dans le développement embryonnaire ; son taux diminuant progressivement durant le développement post-natal de la souris [147]. D'autres modèles ont vu le jour, comme chez la drosophile. Notamment, une déplétion de TDP-43 dans ce modèle entraîne une réduction

de sa longévité, un déficit locomoteur et une anomalie des jonctions neuromusculaires [148].

Notre laboratoire s'est concentré sur une modélisation de la SLA chez *C. elegans*. Pourquoi ? Ce nématode de 1mm est une incroyable ressource génétique, moléculaire et cellulaire pour comprendre des mécanismes qui seraient plus complexes chez les mammifères. C'est notamment le premier organisme dont le génome a été entièrement séquencé.

- Les tests sont rapides puisque leur cycle de vie est d'environ 1 mois mais peuvent passer dans un cycle de résistance (« dauer ») et vivre sans nourriture jusqu'à 3 mois.
- Ils se cultivent facilement sur des boîtes de pétri contenant un milieu nutritif (NGM, nematode growth medium), généralement à 20°C, mais se conservent bien à température ambiante.
- Ils se congèlent.
- La plupart des gènes sont cartographiés et possèdent des variants génétiques disponibles sur le marché et non dispendieux.
- Les phénotypes sont simples à voir : une paralysie se détecte par un arrêt de locomotion, mais discriminable de la mort puisque le ver bouge la tête pour se nourrir et la pompe pharyngale est visiblement fonctionnelle ; les tests de fluorescence *in vivo* sont possibles puisque le ver est transparent, etc.
- Des tests automatisés notamment grâce à la machine « Worm MicroTracker » sont à disposition afin de mesurer la locomotion sans biais de subjectivité.
- La répression de traduction d'ARNm en protéine est possible par ARN interférence (ARNi) très simplement (les ARNi sont insérés dans des bactéries qui sont la source nutritive des vers).
- Et enfin, des tests pharmacologiques sont possibles (sans soucis éthiques) sur des vers en culture sur milieu solide ou en milieu liquide.

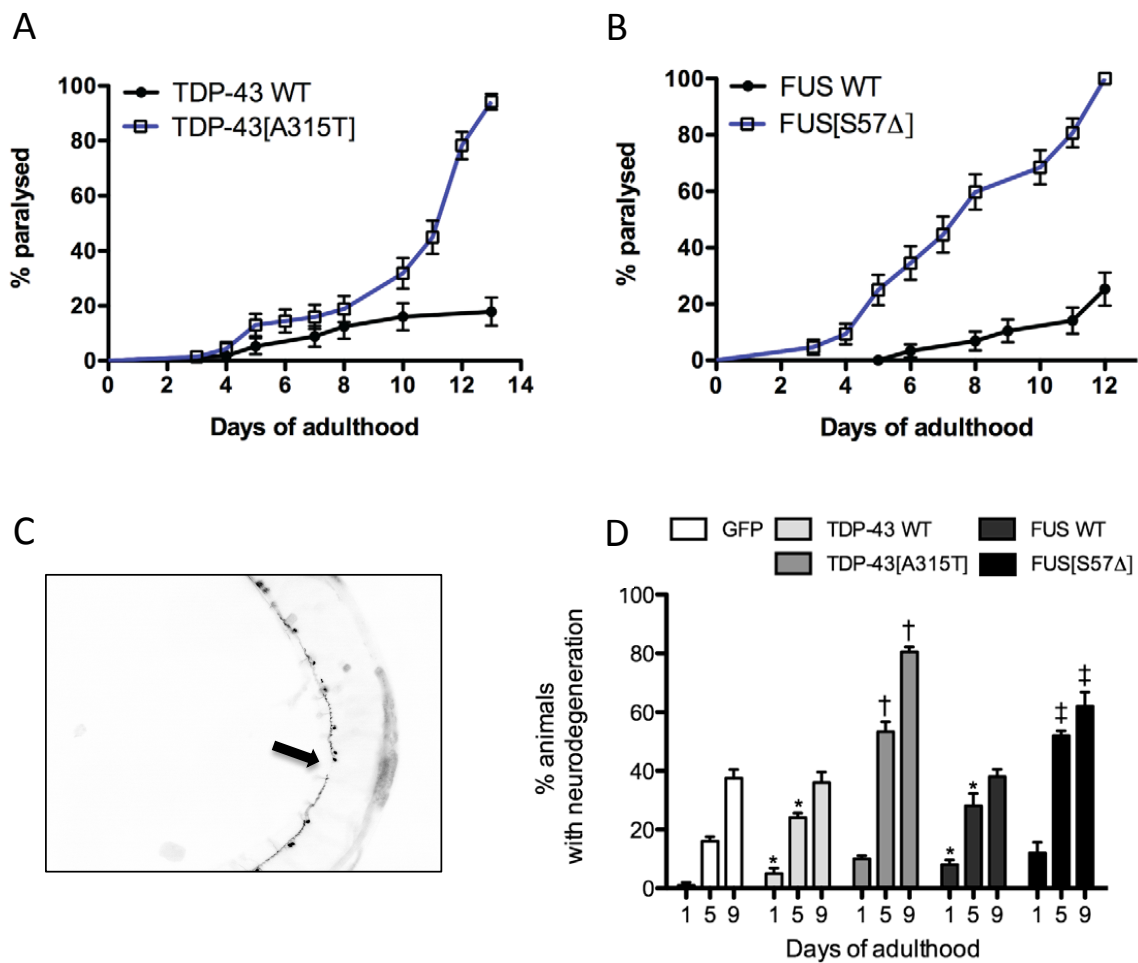
La locomotion du ver sinusoïdale est dirigée par un ensemble neuronal innervant les muscles jonchant la paroi cuticulaire. Les neurones moteurs (ou motoneurones) envoient un signal excitateur par le biais du neurotransmetteur acétylcholine (motoneurones A et B)

aux muscles afin de permettre la contraction, tandis que les muscles antagonistes sont relâchés grâce à un neurotransmetteur inhibiteur de type GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid, motoneurones D), à l'instar de ce qui se passe chez l'homme. Ainsi 26 motoneurones GABAergiques s'articulent sur une corde principalement ventrale et connectés à la corde dorsale. Quatre paires d'interneurones sont partie intégrante du circuit locomoteur en parcourant *C. elegans* de part en part et en innervant les motoneurones de la corde ventrale [149].

Concernant les modèles de SLA chez le ver, des laboratoires se sont attelés à caractériser les phénotypes de nématodes mutants pour des gènes pertinents. Ainsi, une mutation dans le gène de l'homologue de *TARDBP* chez *C. elegans* *tdp-1*, et causant une perte de fonction de la protéine, n'engendre qu'un très léger problème locomoteur, un déficit de croissance et de fertilité [150]. Le gène orthologue à *C9ORF72* chez le ver existe, il s'agit de *alfa-1*. Par exemple, la souche *alfa-1(ok3062)* montre un phénotype locomoteur chronique [151].

Notre laboratoire a mis sur pied un modèle où le gène humain *tardbp* codant pour la protéine TDP-43, que ce soit la version sauvage ou mutante, a été injecté puis inséré dans le génome du nématode *C. elegans*. Son expression est régie par le promoteur *unc-47*, codant pour une protéine vésiculaire des neurones GABAergiques. En d'autres termes, la protéine TDP-43 n'est exprimée que dans les neurones GABAergiques. Le même schéma a été appliqué pour l'expression du gène *fus* chez *C. elegans*. Ces deux transgènes montrent une paralysie progressive et une neurodégénérescence des neurones GABAergiques au cours du temps (Figure 5).

Il faut savoir que d'autres modèles de SLA existent chez *C. elegans*. Par exemple une expression de la protéine humaine SOD1 dans les neurones moteurs du ver cause une agrégation de la protéine, un déficit locomoteur et du guidage axonal, des processus synaptiques anormaux, ainsi qu'une neurodégénérescence [152,153]. Nous disposons au sein de notre laboratoire d'une souche similaire, mais entre nos mains nous n'avons jamais observé un quelconque déficit locomoteur.



**Figure 5 : Paralysie et neurodégénérescence des neurones GABAergiques induites par TDP-43<sup>A315T</sup> ou FUS<sup>S57Δ</sup>.** A. Comparaison des paralysies des vers transgéniques ayant la forme sauvage de TDP-43 (TDP-43 WT) ou mutée (TDP-43(A315T)) au cours du temps. B. Même comparaison pour la forme sauvage de FUS (FUS WT) ou mutée (FUS<sup>S57Δ</sup>). C. Photographie de la corde ventrale GABAergique illuminée par fluorescence grâce au transgène *unc-47p::GFP*. La flèche indique une discontinuité de la corde indiquant une neurodégénérescence. Image traitée par Photoshop en noir et blanc et dont les couleurs ont été inversées pour favoriser la visibilité. D. Quantification de la neurodégénérescence des différentes souches aux jours 1, 5 et 9 de vie adulte du ver. \* $p < 0,05$  comparé à *unc-47p::GFP*, + $p < 0,001$  comparé à TDP-43 WT et ++ $p < 0,001$  comparé à FUS WT, d'après le t-test two-tailed. A, B et D, d'après Vaccaro *et al.* 2012 [154].

## **I.2.LE ROLE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE DANS LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE**

### **I.2.1. Evidences d'une réponse immune dans la sclérose latérale amyotrophique**

#### *I.2.1.1. Au niveau cellulaire*

Dans la SLA, les neurones, essentiellement moteurs, dégénèrent. Cependant, de nombreuses études se sont attelées à démontrer que d'autres types cellulaires étaient engagés dans ce processus. Que ce soit dans les modèles murins ou chez des patients ayant la SLA, des astrocytes réactifs à la périphérie des neurones dégénérant ont été observés. Par ailleurs, en 2007 une étude utilisant des cellules souches embryonnaires de souris SOD1<sup>WT</sup> ou SOD1<sup>G93A</sup> pouvant se différencier en motoneurones montrait que lors d'une co-culture avec des cellules gliales SOD1<sup>G93A</sup>, ces dernières entraînent une mort des neurones moteurs sans distinction quant au génotype de ceux-ci [155]. L'année suivante, la même équipe publiait des résultats concordants avec des cellules souches embryonnaires humaines, différenciées en motoneurones ou en interneurones. Co-cultivées avec des cellules gliales sur-exprimant SOD1<sup>G93A</sup>, ils observent un effet négatif sur la viabilité des motoneurones, mais pas des interneurones, suggérant un effet inter-cellulaire spécifique. Cette même étude montre également une augmentation de facteurs immunitaires que nous détaillerons dans la partie suivante. Dans les modèles murins classiques de SLA SOD1<sup>G93A</sup> et SOD1<sup>G37R</sup>, une activation microgliale survient de manière très précoce [156-160]. L'activation astrocytaire et lymphocytaire arriverait plus tardivement (un mois et demi après environ chez la souris) [156].

Des études *post-mortem* chez des patients atteints de SLA ont révélé une activation des microglies/macrophages dans des régions du cerveau lésées ainsi que des lymphocytes T « helper » CD4+ et cytotoxiques CD8+ le long des capillaires irrigant ces zones [161]. Plus intéressant encore, dans une étude chez 10 patients ayant la SLA et 14 patients sains, l'utilisation d'un ligand marquant l'activation microgliale et possédant un radioisotope du carbone a permis par tomographie à émission de positrons (TEP) de voir que dans le cortex

moteur, le pons, le cortex préfrontal et le thalamus des patients ayant la SLA, l'activation microgliale était plus élevée. Ces observations étaient en corrélation avec l'évolution des signes cliniques des patients [162]. Bien que les cellules gliales - et entre autres les microglies, cellules immunitaires du système nerveux - jouent un rôle prépondérant dans le processus de mort cellulaire des neurones moteurs, la mécanistique sous-jacente reste encore inconnue.

#### *I.2.1.2. Au niveau moléculaire*

Globalement, les processus neurodégénératifs observés dans la SLA sont accompagnés d'une neuroinflammation.

- Premièrement, des cytokines pro-inflammatoires ainsi que d'autres facteurs immunitaires sont relâchés en plus grande quantité par les cellules [163]. Frakes et ses collaborateurs ont montré *in vitro* et *in vivo* que la mort des motoneurones *via* la microglie nécessite la voie NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B), une protéine intracellulaire, composante clé du système immunitaire activée notamment lorsque des ligands se fixent aux récepteurs Toll-like (TLR) [164].
- Il apparaît également que l'expression spécifique de gènes impliqués dans l'inflammation augmente - au moins au niveau astrocytaire - chez des patients atteints de SLA sporadique ou héréditaire [165].
- La quantité d'immunoglobulines (dans le cas de cette étude, la protéine ICAM-1, Inter-cellular adhesion molecule -1) dans la moelle-épineuse chez des souris SOD1<sup>G93A</sup> à 40 jours augmente comparativement aux souris contrôles. Au même moment, une réactivité de l'IgG et d'un de ses récepteurs le Fc $\gamma$ RI (Fragment crystallizable region *gamma* receptor I) apparaît dans les neurones moteurs [156].
- L'augmentation de la quantité du récepteur D2 de la prostaglandine - un récepteur immunitaire surtout impliqué dans l'asthme et les allergies - a été également observée [163].
- De plus, suite à une activation au LPS (lipopolysaccharides), une supramolécule isolée à partir de la paroi des bactéries à Gram-négatif qui se lie aux TLRs, les astrocytes et les microglies de souris SOD1<sup>G93A</sup> produisent plus de neurotoxines (nitrites, nitrates,



superoxydes, oxyde nitrique, et de son enzyme l'oxyde nitrique synthase) que les souris contrôles [166,167]. Conséquemment, les microglies possédant SOD1<sup>G93A</sup> induisent plus de dommages aux motoneurones que des microglies SOD1<sup>WT</sup>. Or dans cette dernière étude de Xiao *et al.*, les auteurs ne vérifient pas que les microglies présentent la même quantité ou la même efficacité des TLRs, ce qui, si la différence est avérée, entraînerait forcément une activation biaisée des microglies SOD1<sup>G93A</sup> et donc une variabilité de réponse par rapport aux microglies SOD1<sup>WT</sup>. Par la suite nous verrons qu'effectivement cela pourrait être le cas.

Outre la neuroinflammation, les gènes causatifs de la SLA eux même peuvent être impliqués dans le système immunitaire. Nous en avons parlé précédemment, le gène *C9ORF72* est fortement exprimé dans les cellules microgliales et les macrophages et est impliqué dans le trafic lysosomal et l'inflammation [66]. De plus, les souris *C9ORF72*<sup>-/-</sup> montrent une réponse plus forte en réaction à l'activation des TLRs [66] ainsi qu'une réaction immunitaire anormale, type lupus [67]. Jusqu'à maintenant la fonction du gène *C9ORF72* était inconnue, et ces récentes publications mettent en lumière encore une fois l'activation anormale du système immunitaire.

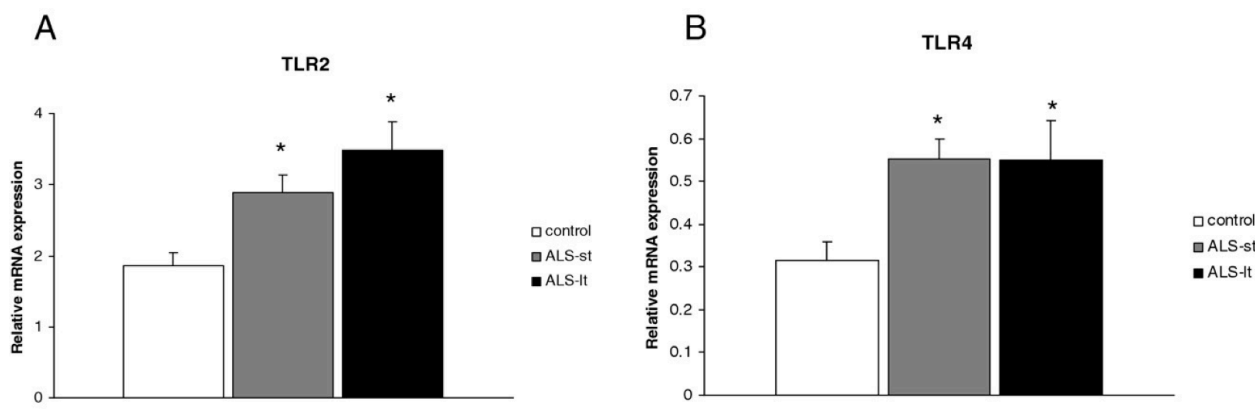
D'un point de vue ionique également il est observé une dérégulation liée à l'immunité. Il a été postulé que les microglies pouvaient agir sur l'hyperpolarisation membranaire causée par l'ouverture de canaux ioniques chlorure (Cl<sup>-</sup>) lors de la présence de GABA ou de glycine – deux neurotransmetteurs inhibiteurs (Pour revue : [168]). Une hyperpolarisation empêche la propagation de potentiels d'action et donc aux messages nerveux de se diffuser.

Enfin, les microARNs sont de petites molécules exprimées par tous types de tissus, microglies y compris, qui sont très efficaces contre les pathogènes puisqu'ils répriment voire dégradent leurs ARNm. C'est en outre l'une des principales défenses immunitaires du ver *C. elegans* [169]. Depuis la première étude en 2012 qui lie microARNs et SLA [170], les recherches ne cessent de s'intensifier. Nous développerons toute une partie sur les microARNs par la suite.

### *I.2.1.3. Les récepteurs Toll-like*

D'une manière générale, les récepteurs Toll-like (TLR) sont des récepteurs dotés de trois domaines majeurs : un domaine extracellulaire riche en leucine (LRR), un domaine Toll/Interleukin-1 et un domaine transmembranaire. Ils sont importants dans le développement cérébral, leur expression varie au cours du temps et ils sont présents dans plusieurs types cellulaires dont les neurones [171]. Les TLRs et plus particulièrement le TLR4 ont été identifiés comme étant impliqués dans de nombreuses conditions neurologiques pathologiques : dans la maladie d'Alzheimer, dans la sclérose en plaques, dans la maladie de Parkinson, suite à des lésions traumatiques, ainsi que dans les processus généraux de neurodégénérescence et enfin dans la SLA (Pour revue : [172]).

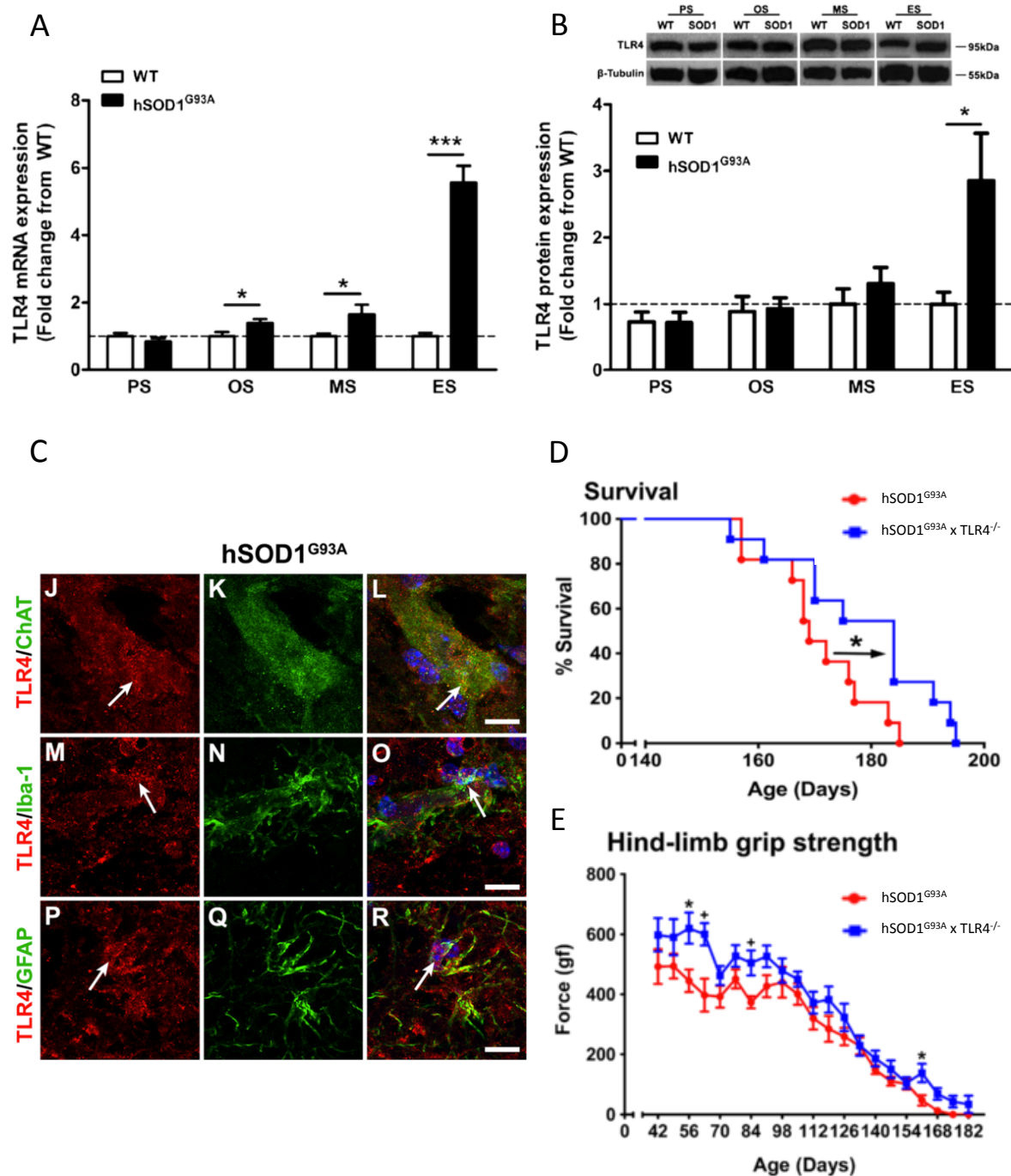
Parmi les composantes immunitaires semblant entrer dans la mécanistique de neurodégénérescence de la SLA, les TLRs se démarquent. À commencer par leur variété. Il existe 10 sous-types de TLRs bien conservés chez l'homme dont le TLR10 qui est non fonctionnel à cause de l'insertion d'un rétrovirus. La souris, elle, possède 12 TLRs (TLR1-TLR9, TLR11, TLR12) (Pour revue : [173]). Ils sont soit membranaires, soit endosomaux ; ligands et voies intra-cellulaires différents mais ont toujours une réponse immune inflammatoire *in fine*. La quantification en *post-mortem* du TLR2 et du TLR4 dans des moelles-épineuses de patients sains ou ayant eut la SLA nous indique une augmentation de leur expression uniquement en cas pathologique (Figure 6). L'analyse immunocytochimique nous indique que le TLR2 se retrouve dans les cellules gliales et dans la substance blanche de la moelle-épineuse et que le TLR4 est fortement exprimé dans les cellules gliales et les neurones, sans égard quant à la rapidité de progression de la maladie [174].



**Figure 6: Augmentation de l'expression des TLR2 et TLR4.** Quantités relatives des ARNm des TLR2 (A) et TLR4 (B) dans la moelle-épinrière de patients sains (control, n=6), ou de patients ayant eu la SLA avec progression rapide de la maladie (<18 mois, n=6, ALS-st (short-term)), ou lente (>48 mois, n=6, ALS-lt (long-term)). \*représente  $p < 0,05$  d'après le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. D'après Casula *et al.* 2011 [174].

Par ailleurs, deux études corroborent ces résultats. La première montrant que les TLR1, TLR2, TLR7, TLR9 et le CD14 (Cluster of differentiation 14) sont sur-exprimés chez les souris  $SOD1^{G93A}$  âgées de 8 semaines par rapport aux souris saines. Néanmoins, ils comparent des souris transgéniques  $SOD1^{G93A}$  à des souris non transgéniques quand il serait plus opportun de les comparer à des souris transgéniques  $SOD1^{WT}$  afin d'éliminer l'effet de la surexpression de la protéine elle-même. Les auteurs affirment également avoir retrouvé des phagocytes mononucléaires positifs pour le TLR2 et le CD14 dans la moelle épinière de patients ayant la SLA, mais aucun résultat n'est à l'appui [158]. La deuxième étude porte sur un modèle de souris  $SOD1^{G93A}$  et ne concerne que le TLR4. Les auteurs montrent pour commencer que ces souris comparées aux  $SOD1^{WT}$  ont un niveau d'ARNm du TLR4 plus important à partir du début des symptômes et jusqu'aux stades tardifs de la progression de la pathologie, mais aussi une augmentation du niveau protéique de TLR4 aux stades tardifs (Figure 7A-B) [175]. Par immunohistochimie sur du tissu de moelle-épinrière de souris  $SOD1^{WT}$ , une co-localisation du TLR4 avec un marqueur des

motoneurones uniquement (l'acetylcholine esterase, ChAT) est observée tandis que chez les souris SOD1<sup>G93A</sup>, le TLR4 est présent dans les motoneurones, les astrocytes et la microglie lorsque les symptômes sont clairement déclarés (Figure 7C). Enfin, le croisement des souris transgéniques avec des souris « knock-out » pour le TLR4 (i.e dont le gène du TLR4 possède une mutation délétère) permet de voir une augmentation de la force de saisie des pattes arrières et une survie plus longue que les souris ayant un TLR4 présent et fonctionnel (Figure 7D-E), ce qui nous indique la fonction délétère de ce récepteur [175]. En résumé, l'expression des TLRs varie dans les cas pathologiques de la SLA.



**Figure 7 : Le TLR4 aggrave les déficits moteurs et réduit la longévité dans un modèle de souris SOD1<sup>G93A</sup>.** A. Quantités relatives d'ARNm du TLR4 dans les moelle-épineuses de souris SOD1<sup>G93A</sup> comparées aux souris SOD1<sup>WT</sup> à 4 stades de la maladie (n=9/groupe). B. Quantification protéique du TLR4 dans les moelle-épineuses (Western-Blot en haut avec  $\beta$ -tubuline comme contrôle invariable ; semi-quantification par densitométrie en bas) chez des souris SOD1<sup>G93A</sup> comparées aux souris SOD1<sup>WT</sup> (n=3-4/groupe). La ligne en pointillée représente la valeur de base contrôle. Les barres d'erreurs représentent les moyennes  $\pm$  s.e.m.  $p < 0,05$  d'après le t-test. PS : pré-symptomatique ; OS : début des symptômes (onset) ; MS : au milieu de la phase déclarée (mid-symptomatic) ; ES : stades finaux (end-stage). C.

Co-localisation du TLR4 (en rouge, J, M, P) avec un marqueur des motoneurones (ChAT, vert, K), microglial (Iba-1, vert, N) ou astrocytaire (GFAP, vert, Q) dans du tissu de moelle-épinrière de souris ayant le transgène humain SOD1<sup>G93A</sup>. Une superposition des images avec un marqueur du noyau (bleu) est indiquée en L, O et R. Echelle : 10 µm. D-E. Courbes de survie (Survival, D, n=11) et de force de saisie des pattes arrières (Hind-limb grip strength, E, n=8-9) des souris SOD1<sup>G93A</sup> (rouge) en absence de TLR4 (bleue). \*p<0,05 d'après le test Log-Rank de Mantel Cox pour la courbe de survie et +p<0,1 et \*p<0,05 d'après le test de student pour la courbe de force. Les données représentées sont des moyennes +/- s.e.m. D'après Lee et al. 2015 [175].

---

Outre que le niveau d'expression varie, les TLRs semblent être anormalement activés. Plusieurs équipes se sont penchées sur ce phénomène. Ainsi, la protéine mutée SOD1<sup>G93A</sup> en milieu extracellulaire active les microglies grâce au TLR et à son co-récepteur le CD14. Les auteurs suggèrent une interaction directe beaucoup plus forte entre la protéine malformée SOD1<sup>G93A</sup> et le CD14 qu'avec la protéine « sauvage » SOD1<sup>WT</sup> [159]. De même, dans une culture de lignée microgliale BV2 sur-exprimant la protéine SOD1 mutée et cela indépendamment de la mutation (G93A, L8Q, ou encore G10V testées), une forte sécrétion de cytokines neurotoxiques et du facteur pro-inflammatoire TNF-α (Tumor necrosis factor α) a été observée suite à l'activation du TLR2 [176].

Enfin, la modulation des TLRs peut avoir un impact sur la dégénérescence des motoneurones dans la SLA. Entre autres, le modèle murin SOD1<sup>G37R</sup> possède une réponse immunitaire au LPS normale, cependant des injections systémiques chroniques exacerbent la dégénérescence des motoneurones [177]. Or, rappelons que le LPS se lie directement et spécifiquement au TLR4 et dans une moindre mesure au TLR2. Récemment il a été trouvé qu'un antagoniste du TLR4 était neuroprotecteur dans un modèle de co-culture primaire motoneurones/glie obtenue à partir de souris SOD1<sup>G93A</sup>. Si les TLRs semblent jouer un rôle important dans la pathologie, le signal de danger se liant aux TLRs et les voies intracellulaires activées restent inconnus [178].

### **I.2.2. Mort neuronale et implication de Sarm1/TIR-1**

#### *I.2.2.1. Les différentes morts cellulaires*

Connaître la manière dont une cellule meurt renseigne sur les événements ultérieurs et futurs. Il existe bien des morts cellulaires, programmées ou non. Nous allons détailler de manière non-exhaustive certaines d'entre elles et en donner quelques caractéristiques.

L'apoptose est le processus de mort cellulaire programmée le plus connu. La mort par apoptose intrinsèque est provoquée par des stimuli tels que des dommages à l'ADN et survient à travers la famille Bcl-2. Cette activation de Bcl-2 entraîne la relâche de cytochrome c par les mitochondries vers le cytosol ; ce qui active un complexe de caspases (autrement appelé apoptosome). Ce complexe clivera les protéines intracellulaires. La mort par apoptose extrinsèque nécessite l'activation d'un récepteur extracellulaire tel que le récepteur TNF (TNFR, Tumor necrosis factor receptor). L'apoptose est caractérisée, entre autres, par la compaction de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et la vacuolisation du cytoplasme par invagination de la membrane plasmique (Pour revue : [179]).

L'autophagie est un terme qui désigne la destruction du contenu cellulaire par ses propres lysosomes. Les vacuoles ainsi formées sont également nommées autophagosomes. Ce phénomène se produit en conditions de stress intense et requiert la voie mTOR (mammalian target of rapamycin)[179].

La nécrose, quant à elle, a longtemps été considérée comme une mort accidentelle et incontrôlée. Cela est vrai lors d'atteintes physiques, de stress osmotique, d'acidification du milieu, de stress thermique, etc. Dans ce cas, une perte de l'intégrité membranaire est observée, ainsi qu'une augmentation du volume de la cellule et un gonflement des organelles. Cette mort cellulaire est très rapide et implique une réaction immunitaire suite aux débris relâchés dans le milieu extracellulaire (nous parlerons d'alarmines ou « DAMPs » (Damage-associated molecular pattern) qui peuvent, à leur tour, activer les cellules voisines – Cf. section suivante I.2.2.2). La nécrose est indépendante des caspases [179-181]. Néanmoins des évidences pointent du doigt que l'activation de récepteurs, à l'instar des récepteurs TNF, des TLRs, par exemple par des DAMPs ou des PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern), peut initier ce type de mort cellulaire, ce qui rend le phénomène « programmé » et non accidentel. Dans ce cas, nous parlons de nécroptose.

La sarmoptose est une sorte de necroptose impliquant la voie Sarm1. Nous la détaillerons dans la section I.2.2.3 [182].

Il existe un autre phénomène de mort cellulaire programmée, qui reste incertain s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de la ségrégation de chromosomes et d'une mitose incomplète : on appelle ce processus une « catastrophe mitotique » (Pour revue : [183]).

La pyroptose est une des morts cellulaires décrite dans les monocytes, macrophages et cellules dendritiques infectées par des bactéries. Ce processus est dépendant de la caspase-1. Des ions s'infiltrant dans la membrane, formant des pores, ce qui entraîne un influx d'eau et la mort cellulaire à terme. De plus, une réaction immunitaire est déclenchée par production de cytokines pro-inflammatoires suite à la libération dans le milieu extracellulaire des composés cellulaires après rupture de la membrane plasmique. De manière similaire à l'apoptose, nous retrouvons dans la pyroptose une fragmentation de l'ADN et une condensation de la chromatine [184] (Pour revue : [185]). La pyroptose est à ne pas confondre avec la paroptose, un autre concept de mort cellulaire, sans activation de caspase, ni de fragmentation d'ADN, ni de condensation de la chromatine. On y retrouve une vacuolisation et un enfllement des mitochondries et du réticulum endoplasmique. La paroptose est activée par des canaux potassium et une contribution calcique (Pour revue : [186]). Néanmoins ces types de mort cellulaire sont peu connus. De même que la ferroptose, une mort cellulaire dépendante du fer [186], la méthuose, une mort cellulaire proche de l'autophagie à quelques distinctions protéiques près [186] et la charontose (en référence à Charon, de la mythologie grecque), une mort indépendante des caspases mais dépendante de protéases lysosomales, au moins en partie, chez des cellules souches embryonnaires de souris [187]. Quelques articles ont fait mention d'autres types de mort cellulaire (non nommées) impliquant des voies différentes de celles décrites précédemment, mais du fait de leur faible rayonnement dans la littérature, nous ne les détaillerons pas (pour exemple se référer à [188] ou encore à [189]).



#### *I.2.2.2. Les signaux de danger*

Différents signaux peuvent témoigner d'un danger pour la cellule ; ils sont exogènes ou endogènes. Les signaux exogènes peuvent être d'origine microbienne - que l'on appelle communément les « PAMPs », comme le sont les lipopolysaccharides (LPS) de la paroi des bactéries à Gram-négatif - ou non-microbienne où l'on retrouve notamment des allergènes et autres corps étrangers. Les signaux produits de manière endogène par un tissu lésé sont encore appelés « Alarmines » ou « DAMPs ». Ces molécules sont exprimées et sécrétées lors de la mort cellulaire non programmée, ainsi que dans des cas d'inflammation. Ainsi, de manière non-exhaustive, ces molécules peuvent être de l'ATP (Adénosine triphosphate), la protéine HMGB1 (High-mobility group box 1 protein), des protéines de choc thermique (HSP, Heat shock protein) ou encore des ARNs [190,191]. Les récepteurs à ces signaux sont les TLRs - que nous avons décrits précédemment (section I.2.1.3) - les récepteurs intracellulaires RLRs (RIG-I-like receptor), les récepteurs transmembranaires CLCs (C-type lectin receptor), les récepteurs cytoplasmiques NLR (NOD-like receptor) et le récepteur transmembranaire RAGE (Receptor for advanced glycation end-products). En réponse à cette reconnaissance par les récepteurs des signaux de danger, se produit une réaction inflammatoire telle que l'activation de la voie Sarm1 [192]. Le rôle des alarmines, et des signaux de danger en général, permettrait *in fine* la restauration de l'homéostasie et la régénération des tissus lésés [191].

#### *I.2.2.3. Nécroptose dans la SLA et implication de Sarm1/TIR-1*

Nombre d'équipes de recherche se sont penchées sur la mort des motoneurones dans la SLA. Sur ce point, les chercheurs ne s'accordent pas sur le mécanisme mis en jeu. Des études montrent que le processus de mort cellulaire est l'apoptose et dépend de l'activation de caspases [193-197] quand d'autres - notre laboratoire y compris - s'affairent à montrer que la mort cellulaire est indépendante des caspases et non-apoptotique [144,198-200]. Pour être plus précis, il serait question de nécroptose, un processus de mort cellulaire nécrotique programmée lié à l'inflammation [201]. Il semblerait premièrement que le mécanisme de mort cellulaire neuronale chez l'Homme ou dans des modèles murins

soit le même et qu'il serait indépendant de la voie des caspases. L'observation cellulaire montre un profil nécrotique. L'inhibition pharmacologique de deux kinases impliquées dans la nécroptose – le RIP-1 (receptor-interacting serine/thréonine protein kinase 1) et le MLKL (mixed lineage kinase-like domain) valide leur implication dans la mort des motoneurones dans la SLA sporadique et familiale et donc le phénomène de nécroptose [201].

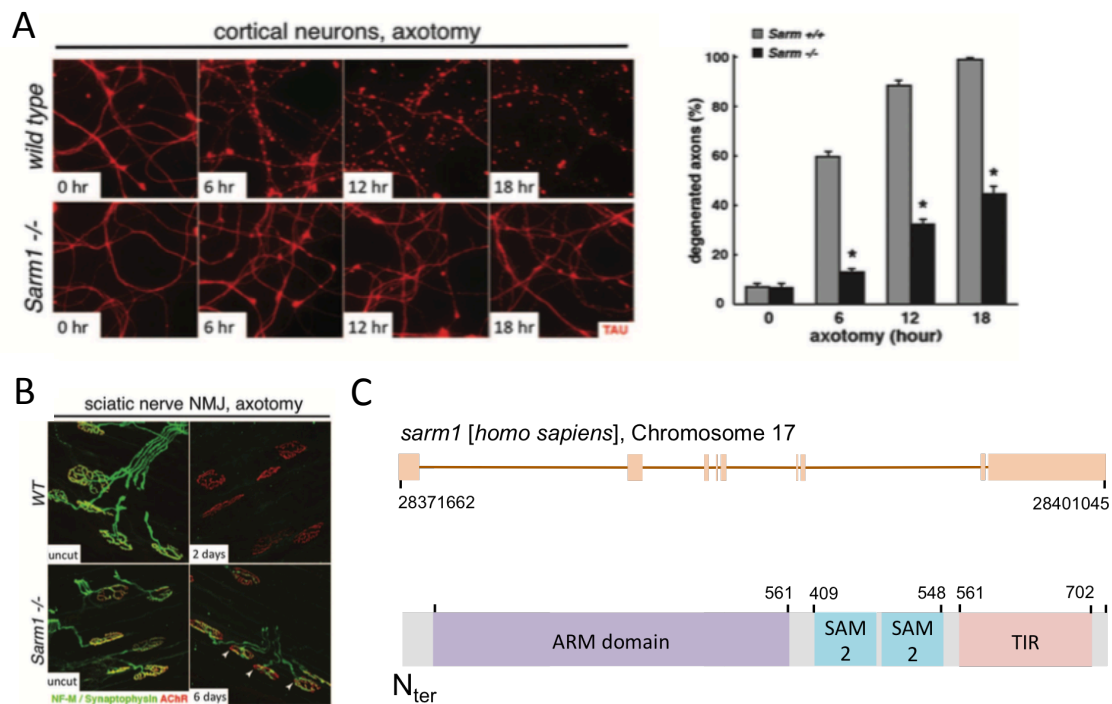
Un autre type de mort programmée, proche de la nécroptose, a récemment vu le jour. Nommée « sarmoptose » par l'équipe de Milbrandt en 2014 [182], cette mort cellulaire programmée module la dégénérescence axonale *via* la protéine Sarm1 (sterile  $\alpha$  and TIR motif-containing 1) et les interactions spécifiques grâce à ses domaines SAM (sterile  $\alpha$  motif) et TIR (Toll-Interleukin-1 receptor) [202] ; elle est caractérisée par un gonflement de la membrane plasmique, d'une crise énergétique, associée à une dérégulation calcique et parfois à une dysfonction mitochondriale [182,203] (Pour revue : [204]). D'un autre côté Sarm1 a également été reliée à l'apoptose des neurones (de manière dépendante de la caspase 3) lorsqu'il stimule les TLRs endosomaux TLR7 et TLR9 [192].

En outre, Sarm1 active la destruction axonale *in vivo* et *in vitro* chez la drosophile. De plus, des souris « knock-out » pour le gène codant pour Sarm1 montrent une protection contre les dysfonctions mitochondriales [182], une diminution de la dégénérescence axonale [203] et une meilleure récupération ainsi qu'une atténuation des lésions axonales suite à une blessure traumatique [205]. Une approche génétique chez la drosophile a également permis d'identifier 3 mutants responsables d'une diminution de la survie axonale, et dont l'unique gène est *dSarm* (drosophila sterile  $\alpha$  motif) [206] (Figure 8A-B).

La protéine Sarm1 est un membre de la famille des TLRs. Elle est composée d'un domaine de localisation à la membrane mitochondriale, de deux domaines SAM impliqués dans les dimérisations et un domaine TIR qui sert à la transmission du signal intracellulaire. La structure du gène codant pour la protéine Sarm1 humaine, ainsi que la protéine elle-même sont représentées ci-dessous (Figure 8C). *Sarm1* est hautement exprimée dans le foie et les reins, ainsi que dans le cerveau. Au niveau de la localisation sub-cellulaire, elle est présente dans le cytoplasme associé aux microtubules, dans les axones, les dendrites, les synapses et les mitochondries. Elle est activée notamment suite à une infection virale, à une privation de glucose ou même suite à des dommages axonaux [182,206,207]. Il semblerait

que cette protéine agisse *via* une diminution de NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adenine dinucleotide)[203,204,208] mais active en parallèle la voie des MAPKs (MAP-kinases ou encore Mitogen-activated protein kinases) [204,209].

Sachant les effets délétères de Sarm1 sur la survie neuronale et son implication dans le système immunitaire et de la voie des TLRs, nous nous sommes légitimement interrogés sur le rôle de son homologue chez *C. elegans*, TIR-1 sur nos modèles de SLA.



**Figure 8: Dégénérescence axonale induite par la protéine Sarm1, et son homologue chez *C. elegans*.** A. (gauche), intégrité axonale d'une culture primaire de neurones corticaux d'embryons de souris E16.5 «sauvages» (wild-type, WT) ou *sarm1*<sup>-/-</sup> à partir de l'axotomie et jusqu'à 18h après. La protéine Tau (en rouge) a été marquée. (droite), quantification des images illustrées à gauche. Les moyennes et les erreurs standard (s.e.m) sont représentées. \*p<0,01. B. Visualisation de jonctions neuromusculaires suite à une axotomie du nerf sciatique *in vivo* chez des souris WT ou *sarm1*<sup>-/-</sup>. Les jonctions post-synaptiques sont

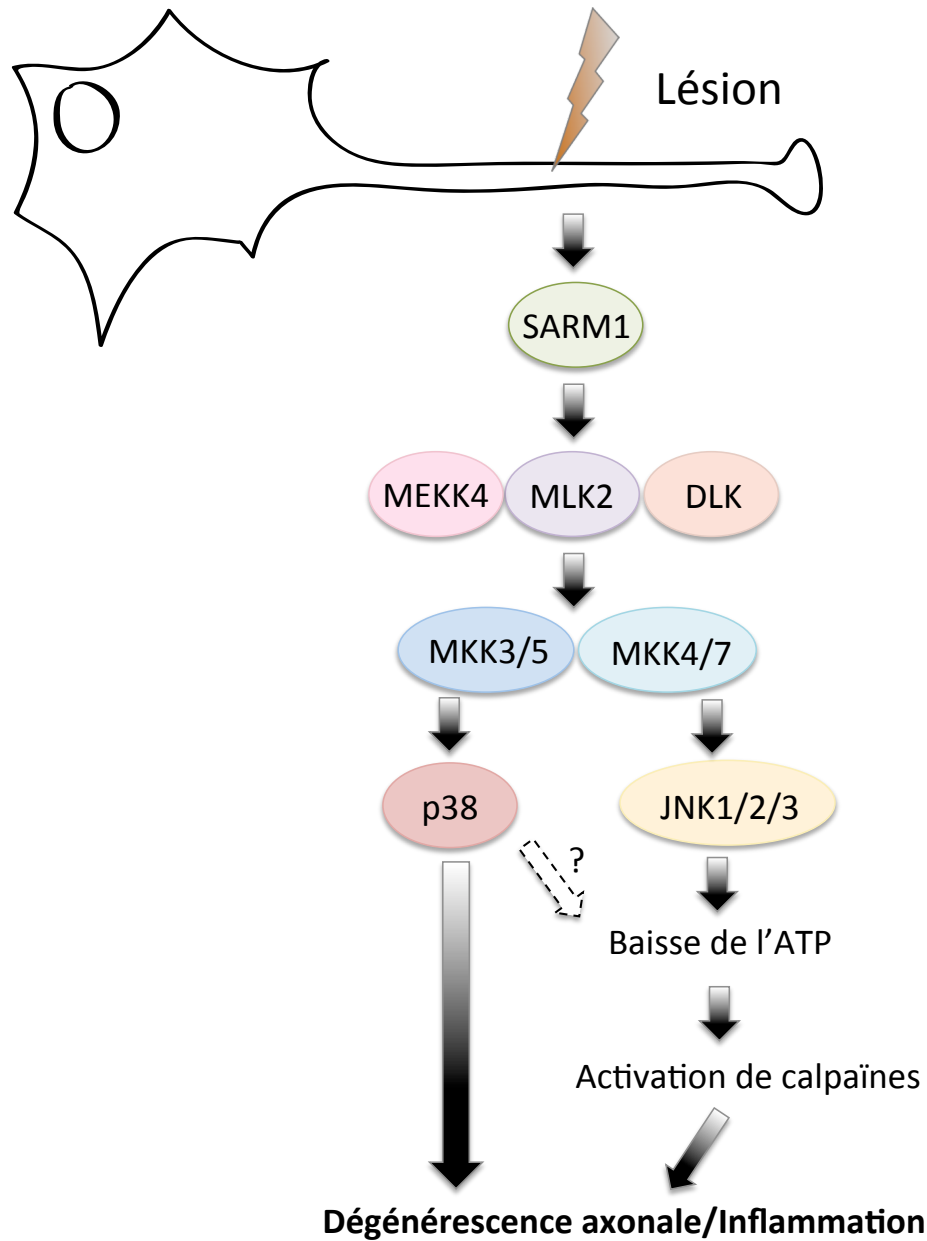
marquées en rouge par un anticorps ciblant les récepteurs à l'acétylcholine (AChR), et la jonction pré-synaptique en vert par un marqueur aux neurofilaments-M(NF-M)/synaptophysine dans les muscles antérieurs de la jambe. Les flèches montrent les plaques motrices. C. (haut), représentation du gène humain *sarm1*, les traits représentent les introns et les « rectangles », les exons. (Bas), la protéine Sarm1 humaine avec ses domaines est illustrée, à partir du N terminal (Nter) en position 1 jusqu'au C terminal (Cter) en position 724. M, localisation mitochondriale ; SAM, Sterile  $\alpha$  motif ; TIR, Toll-Interleukin-1 receptor. (A-B) D'après Osterloh *et al.* 2012 [206].

---

### I.2.3. Implication des MAPKs

En aval de la protéine Sarm1 se trouve une cascade d'enzymes kinases, qui toutes s'activent les unes les autres pour *in fine* mener à l'expression de facteurs de transcription et d'autres gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Récemment, il a été montré que la voie des MAPKs était centrale à la neurodégénérescence dans des conditions pathologiques notamment à travers un dérèglement énergétique cellulaire [209]. Une autre publication de 2015 a mis en évidence que la mort neuronale due à une déplétion de TDP-43 dans les microglies passait par l'activation de la voie MAPK/ERK (Extracellular signal-regulated kinase 1) afin d'activer la cyclooxygénase 2 et la prostaglandine E2 [210]. Et en 2016 une autre étude dans le journal *Neuron* est venue appuyer l'implication de Sarm1 et des MAPKs dans la destruction axonale, entre autres *via* la NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adenine dinucleotide) et à travers un déficit énergétique global [204].

Les protéines de la voie intracellulaire Sarm1 sont principalement des MAPKs (MAP-kinases ou encore Mitogen-activated protein kinases) et sont bien conservées à travers les espèces (Figures 9 et 10). Chez les mammifères, nous retrouvons de manière non-exhaustive en deçà de Sarm1 des MAPKKKs (ou encore MAP-kinase-kinase-kinase ou encore MAP3Ks) telles que MEKK4 (Mitogen-activated protein kinase kinase 4), MLK2 (Mixed lineage kinase 2) et DLK (Dual leucine zipper kinase), plus en aval encore des MAPKKs (ou encore MAP-kinase-kinase ou encore MAP2Ks) telles que les MKK3,4,5 ou 7 (Mitogen-activated protein kinase kinase -3,4, 5 ou 7) et enfin des MAPKs telles que p38 ou JNK-1,2 ou 3 (Jun N terminal kinase -1,2 ou 3). Ces dernières ont des effets néfastes pour la



**Figure 9 : Voie intracellulaire chez les mammifères de l'activation de la voie Sarm1 dans un cas de dégénérescence.** Sarm1 (sterile α and TIR motif-containing 1), MEKK4 (Mitogen-activated protein kinase kinase 4), MLK2 (Mixed lineage kinase 2), DLK (Dual leucine zipper kinase), MKK3/4/5/7 (Mitogen-activated protein kinase kinase 3/4/5/6) et JNK1/2/3 (Jun N terminal kinase 1/2/3). D'après Yang *et al.* 2015 et Pocrnich *et al.* 2009 [209,211].

cellule entraînant la mort cellulaire, par une baisse de l'ATP (Adénosine triphosphate) et l'activation de calpaïnes dans le cas des kinases JNKs ou plus directement dans le cas de p38 [209,211]. Chez des modèles de souris SLA, il est retrouvé une activation anormale de kinases dans les motoneurones, ainsi que des phosphorylations aberrantes et un déficit du transport axonal. Notamment cette interruption de transport due à la mutation dans le gène *SOD1* passerait par une dérégulation de la MAPK p38 [212]. Néanmoins, le rôle de p38 dans le déficit énergétique reste encore à débattre.

La protéine p38 est certainement la plus étudiée de la voie des MAPKs dans le contexte de la SLA. Par exemple, par inhibition pharmacologique ou génétique de p38, une étude récente a montré que la toxicité de TDP-43 chez la drosophile était diminuée au stade adulte et que la neurodégénérescence passait par un stress oxydatif, contrairement à la voie JNK [213]. Par ailleurs, chez des souris *SOD1*<sup>G93A</sup> modélisant la SLA, il a été observé (par immunobuvardage) une accumulation de p38 dans la moelle-épinière des souris pendant la progression de la maladie, ainsi que sa forme phosphorylée en pré-symptomatique [214-216]. De plus, une accumulation de p38 a été retrouvée co-localisée dans les astrocytes hypertrophiés et la microglie activée [214,216]. Enfin, une inhibition pharmacologique de p38 au SB203580 réprime complètement l'apoptose induite par la protéine *SOD1* mutée et l'utilisation de l'inhibiteur semapimod, déjà utilisé en clinique, prolonge légèrement la vie des souris *SOD1* et protège largement les neurones contre la dégénérescence. Ces résultats indiquent la probable implication de p38 dans la SLA et d'une manière plus générale celle des MAPKs [216].

#### **I.2.4. L'immunité chez *C. elegans***

Afin d'étudier la relation entre le système immunitaire et la SLA, nous nous sommes servis du ver *C. elegans* qui fût utilisé dans de nombreuses études pour la grande conservation phylogénétique de son système immunitaire inné. Le ver ne possède pas de cellules immunitaires à proprement parlé comme chez l'Homme bien qu'il ait un certain nombre d'autres mécanismes de défense contre les pathogènes. Il faut rappeler que *C. elegans* vit dans le sol et se nourrit de bactéries, qui elles-mêmes l'infectent et font varier

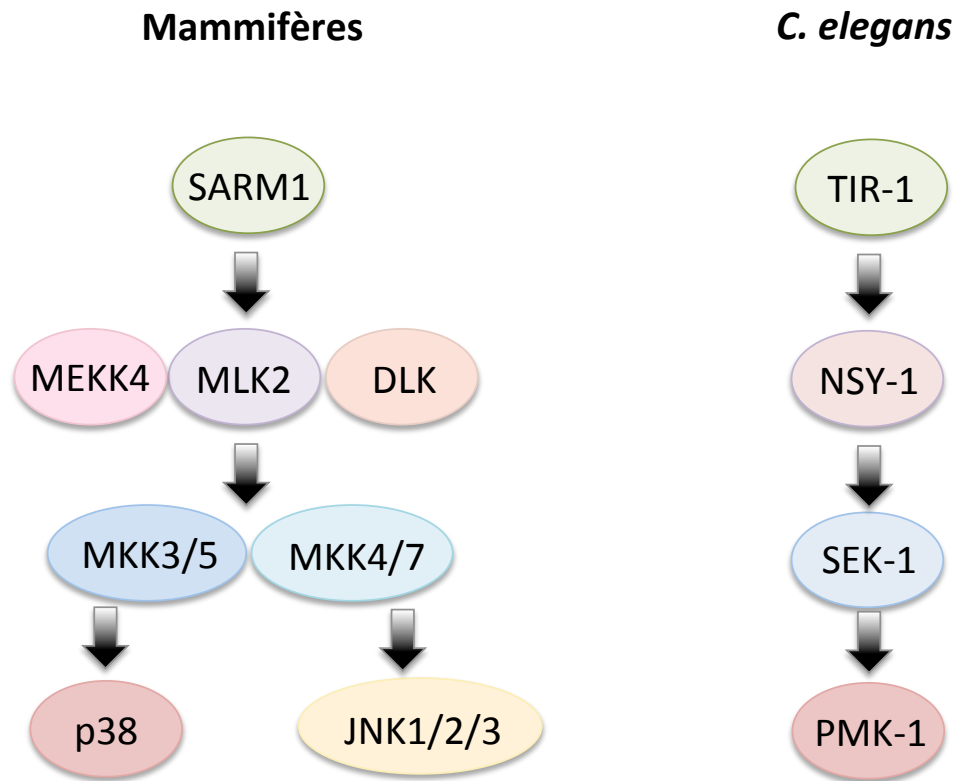
son espérance de vie [217]. Comme composantes immunitaires nous retrouvons (Figure 11) :

#### Les coelomocytes

Les organelles ressemblant le plus à des cellules immunitaires tels que les macrophages sont les coelomocytes chez *C. elegans*. Il a longtemps été pensé que leurs rôles étaient similaires. Néanmoins il s'est révélé que, au nombre de 6, les coelomocytes sont des cellules fixes dont le rôle est la pinocytose, c'est-à-dire le filtrage de particules contenues dans la cavité pseudocoelomique. Des protéines d'endocytoses sont très actives dans ces cellules et le filtrage se fait au gré de la locomotion du ver, à l'occasion du brassage du fluide intracorporel. Les coelomocytes ne sont pas essentiels au ver puisque leur destruction ciblée par des toxines n'affecte ni la longévité du ver ni sa fertilité. Nous retiendrons que les coelomocytes ont un rôle de surveillance immunitaire primitive, mais que les principales lignes de défenses immunitaires sont autres [218].

#### Les voies protéiques

L'intestin et l'hypoderme sont les principales cellules exposées aux pathogènes et elles sont aussi les plus réactives. De nombreuses voies immunitaires innées existent – présentes dans ces types cellulaires, mais pas seulement. De manière non-exhaustive, nous avons la voie DBL-1 (DPP/BMP-like), la voie ERK/JNK, plus impliquée dans la réponse aux infections bactériennes à Gram positif, et la voie des MAP kinases, évoquée précédemment. Cette dernière est principalement composée des protéines intracytosoliques TIR-1 (Toll/Interleukin receptor domain protein 1), NSY-1 (Neuronal symmetry), SEK-1 (SAPK/ERK kinase) et PMK-1 (P38 map kinase family) [219]. Cette voie est particulièrement conservée à travers l'évolution (Figure 11). PMK-1 est capable d'activer le facteur de transcription ATF-7 (Activating transcription factor 7) au niveau du noyau afin d'exprimer certains gènes, dont entre autres le *nlp-29* (neuropeptide-like protein 29), un gène codant pour la protéine NLP-29, un peptide anti-microbien [219,220]. Il est intéressant de noter que cette voie TIR-1 est aussi réactive lors de blessure de l'épiderme du ver [221] ainsi que lors de stress oxydatif [222]. Enfin, une étude a récemment été



**Figure 10 : Comparaison simplifiée de la voie des MAP-kinases chez les mammifères et chez *C. elegans*.** Sarm1 (sterile  $\alpha$  and TIR motif-containing 1), MEKK4 (Mitogen-activated protein kinase kinase 4), MLK2 (Mixed lineage kinase 2), DLK (Dual leucine zipper kinase), MKK3/4/5/7 (Mitogen-activated protein kinase kinase 3/4/5/6) et JNK1/2/3 (Jun N terminal kinase 1/2/3), TIR-1 (Toll/Interleukin receptor domain protein 1), NSY-1 (Neuronal symmetry), SEK-1 (SAPK/ERK kinase), PMK-1 (P38 map kinase family). Inspiré de Irazoqui et al. 2010 [224].

publiée montrant que la voie TIR-1 protège le nématode contre les infections, mais est toxique lorsqu'elle est activée en absence de pathogènes [223].

#### Les peptides antimicrobiens et antifongiques

Certains peptides antimicrobiens ont été détectés chez *C. elegans*. Ils sont relâchés par les cellules afin de perturber la perméabilité membranaire bactérienne et ainsi



combattre l'infection. Ils sembleraient surtout être libérés par l'intestin et l'hypoderme du ver. ABF-1 (Antibacterial factor 1), ABF-2 (Antibacterial factor 2) sont des exemples de peptides antimicrobiens [225] tandis que NLP-29, NLP-31 seraient à la fois antimicrobiens et antifongiques [226].

#### Les ARNs interférents / microARNs

Les principaux composés immuns sont les ARNs interférents (ARNi) et les microARNs, qui jouent un rôle de répresseurs de la traduction lors d'attaque de pathogènes. Il a été montré par différents procédés que les ARNi étaient de puissants outils de défense anti-virale chez *C. elegans* [227,228]. La plupart des études sur les ARNi ont démontré leurs potentiels contre les virus, mais pas contre les bactéries. Une étude utilisant l'infection de *C. elegans* par le bacille *B. thuringiensis* DB27 a pourtant montré une résistance à cette bactérie qui cause des pores intestinaux par la libération de toxines. La souche mutante pour *nasp-1* (human nuclear autoantigenic sperm protein homolog -1), un gène impliqué dans les processus d'ARNi, et la souche mutante pour *dcr-1* ayant une perte de fonction dans sa capacité à maturer les microARNs – et non déficiente dans les processus d'ARNi – sont résistantes à la bactérie *B. thuringiensis* DB27. Ceci suggère un rôle immunitaire des ARNi et des microARNs dans l'immunité antibactérienne. Cette résistance passerait par la voie p38/PMK-1 [229]. De plus, Les microARNs font partie intégrante de la modulation de la réponse immune. Ren et Ambros ont observé en 2015 que la voie TIR-1 chez *C. elegans* inhibe le microARN let-7 qui va moduler la résistance à l'infection [169], tandis que Liu et ses collaborateurs ont montré l'implication de let-7 en aval de PMK-1 lors de la réponse immunitaire innée [230]. D'autres microARNs ont été montrés pour moduler l'inflammation, comme miR-181 [231] et miR-155 [232] chez l'homme et miR-146a chez la souris, pour ne pas être plus exhaustif [233].

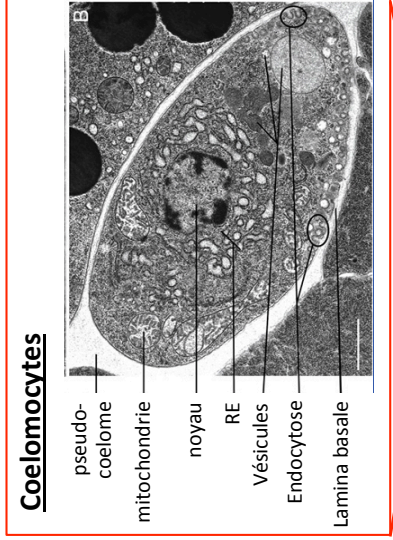
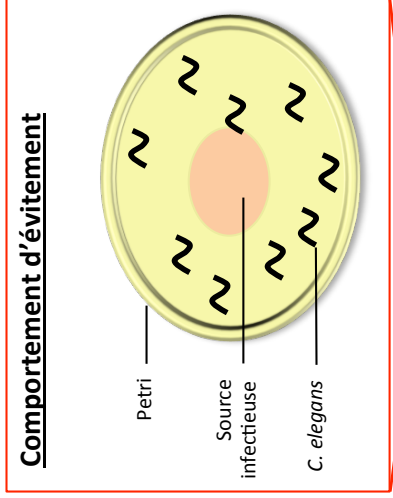
#### Rôle des TLRs

Les TLRs chez les mammifères sont indispensables pour la défense contre les pathogènes. Il était donc naturel de s'interroger sur leurs implications chez le nématode. Le seul homologue des TLRs chez *C. elegans* est TOL-1 (Toll family -1). Le rôle du récepteur TOL-1 chez le ver est énigmatique. En effet, nous savons qu'il a un effet développemental

[234], mais son implication immunitaire est discutable. Néanmoins un mutant pour le gène *tol-1* chez *C. elegans* est particulièrement vulnérable à l'infection par *Salmonella enterica* suggérant tout de même un rôle dans la défense immunitaire {Tenor:2008et}. Aucune étude n'a pu montrer un quelconque lien entre TOL-1 et une voie intracellulaire comme celle des MAP-kinases. Enfin, TOL-1 serait également impliqué dans le comportement d'évitement d'une source infectieuse (Cf. paragraphe suivant) [235] {Tenor:2008et}.

#### Le comportement d'évitement

Il y a des évidences que le système nerveux du ver contrôle son système immunitaire. Par exemple, la voie immunitaire TIR-1 serait régulée par des neurones exprimant le gène *npr-1* [236]. Le gène *npr-1* code pour un récepteur couplé à une protéine G qui dicte le comportement d'évitement en cas de milieu infectieux comme en présence de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* [236,237]. Ainsi le ver préférera contourner la source infectieuse plutôt que de compromettre sa longévité par l'absorption de bactéries néfastes.



Système nerveux GABAergique

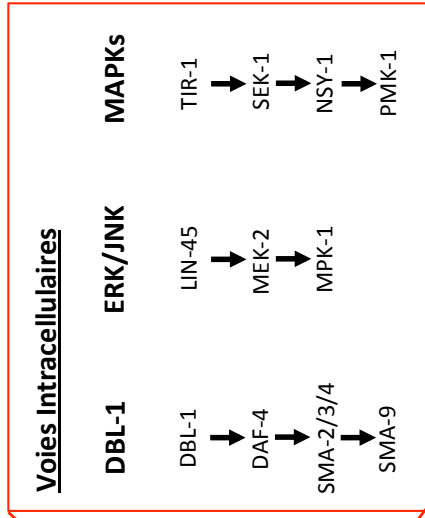
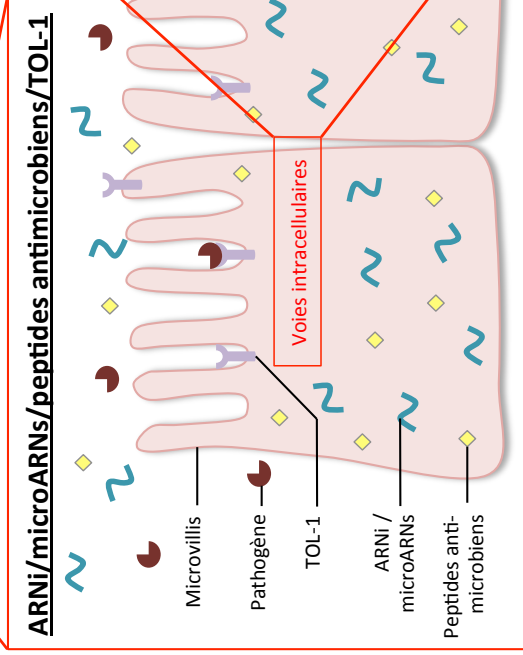
Pharynx

Intestin

TÊTE

QUEUE

Appareil reproducteur



**Figure 11: Systèmes immunitaires de *C. elegans*.** Abréviations: RE (Réticulum endoplasmique), TOL-1 (Toll family -1), DBL-1(DPP/BMP-Like -1), DAF-4 (abnormal dauer formation -4), SMA2/3/4/9 (Small body size -2/3/4/9), LIN-45 (abnormal cell lineage -45), MEK-2 (Mitogen-activated protein kinase -2), MPK-1 (MAP-kinase -1), TIR-1 (Toll/Interleukin receptor domain protein 1), NSY-1 (Neuronal symmetry), SEK-1 (SAPK/ERK kinase), PMK-1 (P38 map kinase family). Photo de coelomocyte tirée du Wormatlas<sup>c</sup>.

---

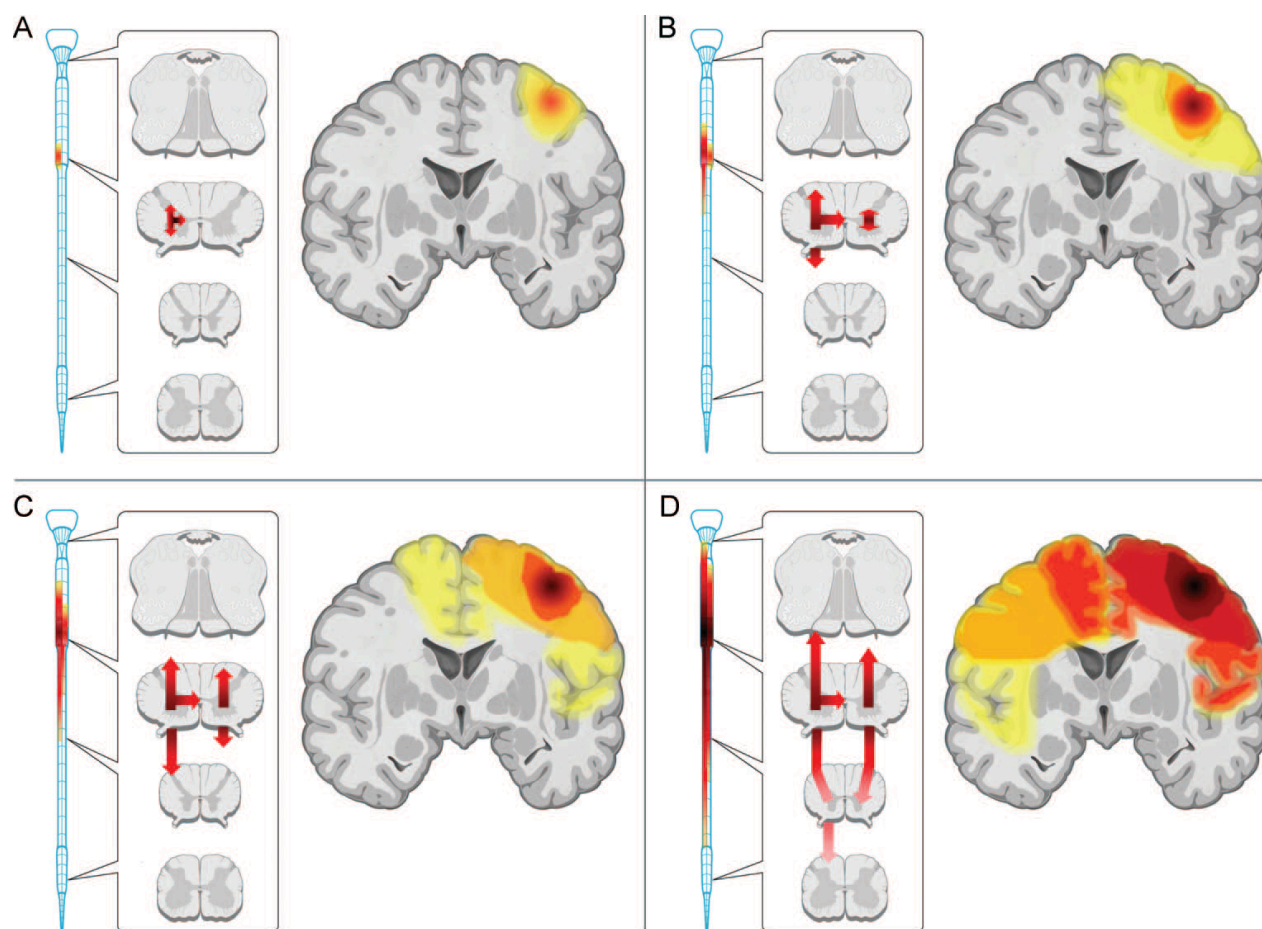
<sup>c</sup> Wormatlas, Chapitre « Coelomocytes system », Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2009.  
doi:10.3908/wormatlas.1.11

## **I.3.LE PROCESSUS DE DIFFUSION DANS LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE : ROLE DES MICROARNs**

### **I.3.1. La diffusion**

L'une des principales caractéristiques de la SLA est la progression de la pathologie à partir d'un point focal et diffusant dans le tissu nerveux au cours du temps (ce que l'on appelle « spread » en anglais) (Figure 12) [238]. Cette diffusion de nature inconnue est indispensable à la progression de la maladie. La mort neuronale nécessite des cellules non neuronales ainsi qu'un signal transitant entre les deux [155]. Bien sur, la théorie de la diffusion de type prion a été avancée. Typiquement, dans les maladies à prion, la cellule, qui normalement est nettoyée de la protéine mal-formée, subit un stress et le processus de nettoyage se fait mal ; la protéine devient pathologique et se diffuse par la suite [239]. En effet, les protéines mal-repliées SOD1 d'une cellule atteinte sont capables de transférer vers des cellules saines sans nécessité de contact direct, afin de les « infecter » [157,240].

Cette constatation s'est vérifiée dans des modèles murins, dans des cultures cellulaires ou encore dans des cultures de neurones ou d'astrocytes dérivés de cellules progénitrices prélevées lors d'autopsies chez des patients ayant eut une SLA sporadique ou dont le gène *SOD1* est déficient [157,165] (Pour revue : [241]). Il semblerait en outre que SOD1 soit sécrétée dans le milieu extracellulaire *via* des exosomes et pouvant potentiellement affecter les motoneurones [242]. Cependant, basés sur la cinétique de perte des motoneurones au cours du temps, des chercheurs ont avancé l'hypothèse que la formation d'agrégats de SOD1 mal-repliés serait plutôt neuroprotectrice [243].



**Figure 12 : Modèle idéalisé de la diffusion de la SLA à partir d'un point focal.** A. Début des symptômes, dégénérescence des neurones moteurs supérieurs et inférieurs au niveau d'un point focal (en rouge). B. Diffusion précoce : la neurodégénérescence commence à s'étendre autour du point focal et les manifestations cliniques deviennent complexes. C. Diffusion continue vers l'extérieur : la diffusion s'étend rostro-caudalement et latéralement. D. Diffusion avancée : la dégénérescence est étendue et symétrique dans l'espace. Au niveau focal la dégénérescence est intense (rouge foncé) et les motoneurones touchés sont éloignés de l'origine (jaune/orange). D'après Ravits *et al.* 2009 [238].

Les protéines FUS et TDP-43 ont également un domaine « prion-like » qui leur confère les mêmes propriétés qu'à SOD1 [244] (Pour revue : [245]). TDP-43 phosphorylée transite entre les cellules et une forme mal-repliée « infecte » les protéines TDP-43 « saines » [244]. Dans une co-culture entre des motoneurones et des cellules musculaires ou des astrocytes exprimant TDP-43 ou FUS mutés, il est observé une mort des motoneurones, montrant encore une fois l'importance du processus de diffusion [246,247]. TDP-43 chemine le long de l'axone et est transmise entre autres aux terminaisons axonales par des microvésicules [39,248].

La propagation du signal de danger se ferait par divers moyens : soit par relâche par les cellules de complexes protéines-ARNs directement, soit par encapsidation dans des microvésicules/exosomes captés par des récepteurs et internalisés ou non, soit via des tunnels formés entre deux cellules voisines [245,249]. Il est intéressant de constater que des variants pour le gène codant une protéine présente aux zones actives synaptiques – la protéine UNC-13A (Uncoordinated protein -13 homolog A, encore appelée Munc-13-1) – a été montrée impliquée dans la SLA [250]. En effet, lors d'une étude d'association pangénomique sur quelques milliers de patients ayant une SLA sporadique *versus* individus sains, il a été trouvé que le variant rs12608932 au loci 19p13.11 était lié au phénotype SLA [251] ; ce qui a été de multiples fois vérifié par la suite [252-254]. De surcroît, il semblerait même que UNC-13A ne soit pas juste associée à la SLA mais ledit variant diminuerait la survie des patients ayant la SLA [252]. UNC-13A est une protéine interagissant avec le domaine en doigt de zinc N terminal des protéines RIM (Rab-3-interaction molecules) ainsi que d'autres protéines des vésicules synaptiques [255] (Pour revue : [256]). D'une manière générale, elle influence le relargage synaptique [257]. Son rôle est conservé de *C. elegans* à l'Homme [258]. La libération de molécules par les neurones semble donc cruciale dans la pathogénicité cellulaire.

Malgré la propagation de ces protéines dans la SLA, comment expliquer que le même mécanisme se retrouve dans les différentes formes de SLA alors que chaque patient a un historique familial et génétique unique ? D'autant plus que par exemple TDP-43 est une protéine ubiquitaire mais la mort cellulaire ne touche principalement que les neurones moteurs. Il n'est pas exclu que d'autres facteurs solubles soient à l'origine de la

transmission de la pathologie aux tissus avoisinants [166], comme le pourraient être les microARNs, extrêmement labiles et spécifiques à certains tissus.

### **I.3.2. Définitions et fonctions physiologiques des microARNs**

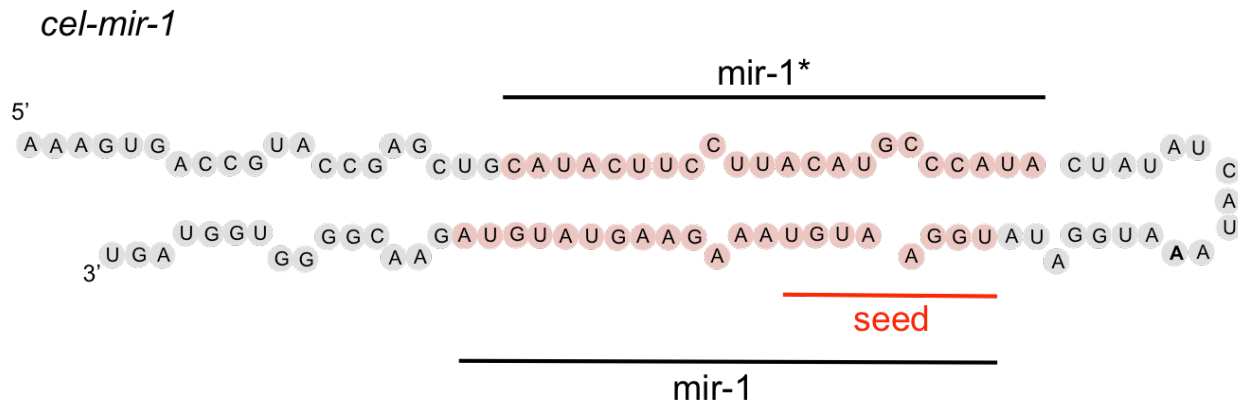
En 1993, Victor Ambros et ses collègues Rosalind Lee et Rhonda Feinbaum découvrent pour la première fois que le gène *lin-4* (Abnormal cell lineage -4) code pour un microARN qui contrôle le développement larvaire chez *C. elegans* [259]. Depuis la découverte de ces petits ARNs d'environ 22 nucléotides de long, l'intérêt pour ces molécules n'a cessé d'accroître. D'un point de vue évolutif, les microARNs sont très conservés comme nous le verrons par la suite, ils sont présents très tôt dans la phylogénèse, notamment chez les éponges (*Amphimedon queenslandica*) et même chez des organismes unicellulaires tel que *Chlamydomonas reinhardtii*, ainsi que chez les plantes. Il semblerait toutefois que les microARNs soient absents chez les champignons (Pour revue : [260]). Nous allons détailler par la suite leur structure, leurs mécanismes d'action, leur spécificité, leur rôle dans la communication inter-cellulaire ainsi que leur biogénèse.

#### *I.3.2.1. Structure*

D'un point de vue structurel, les microARNs sont de simples brins d'ARN, d'une vingtaine de nucléotides. Le gène code pour un pri-miARN qui va subir des modifications post-transcriptionnelles - que nous détaillerons par la suite - en pré-miARN. Ces deux structures se replient sur elles-mêmes par complémentarité formant une structure en épingle à cheveux (appelée 'hairpin structure' en anglais). Puis cette structure va être clivée pour former deux microARNs matures, un brin de 3' vers 5' qui sera le brin sens et un brin 5' vers 3', antisens, que l'on annote avec un astérisque. Les microARNs ont une région 'seed' qui correspond à une région ultra-conservée, entre les différents sous-types d'une même famille et même entre les espèces (Figure 13). En ce qui concerne la nomenclature, on pourra ajouter l'espèce avant le microARN. Par exemple pour le gène du microARN let-7



chez l'Homme *Homo sapiens* on notera *hsa-let-7*, chez la souris *Mus musculus* on notera *mmu-let-7* et chez *Caenorhabditis elegans*, on notera *cel-let-7*.



**Figure 13 : Structure en épingle à cheveux du microARN miR-1 chez *C. elegans*.** Les nucléotides en rouge sont ceux qui formeront les microARNs matures. La région 'seed' UGUAAGGU est indiquée, ainsi que les microARNs sens miR-1 et antisens miR-1\*. D'après les données de miRBase (<http://www.mirbase.org>).

#### I.3.2.2. Actions

Les microARNs sont donc de petites molécules effectives d'ARN non-codants comme la littérature les décrit. Nous noterons qu'en 2015, il a été montré chez les plantes que les transcrits primaires de microARNs peuvent synthétiser des micro-peptides capables d'activer la transcription des microARNs associés [261], ce qui font d'eux des fragments d'ARN codants. Néanmoins, leur rôle principal se fait sous la forme non codante, en régulant l'expression de gènes et d'ARNm. Leurs rôles sont divers (Pour revue : [260]). Par complémentarité directe de séquence avec un ARNm, ils peuvent bloquer leur traduction en

protéine et parfois entrainer leur clivage par fixation d'argonautes aux régions 'seed'. Il arrive cependant que les microARNs jouent un rôle activateur pour certains gènes, mais cela viendrait de la répression d'un ARNm inhibiteur d'un gène. Il est estimé que chaque microARN a le potentiel de réguler 100 ARNm [260]. Leur stabilité change également au moment de l'amarrage du microARN sur l'ARNm (en positif ou en négatif). Nous voyons de plus en plus dans la littérature de publications sur la modulation par les microARNs de la transcription de gènes ainsi qu'au niveau des histones [262].

Si la plupart des études sur les microARNs se focalisent sur leur rôle répressif d'ARNm au sein de la cellule, il existe des mécanismes d'action « non-conventionnels », où les microARNs fixent directement des protéines, comme les « protéines liant l'ARN » (RNA-binding protein en anglais). Par exemple, la protéine TDP-43 lie directement le microARN miR-8485 chez l'Homme et la souris. S'en suivrait une modulation du neurodéveloppement et même une implication dans des désordres neurologiques [263]. Plusieurs études ont investigué l'impact d'une déplétion de TDP-43 sur les microARNs et ont observé une baisse globale de ces derniers, prouvant un lien entre les deux [38,264,265].

Il faut savoir que toutes les voies métaboliques sont touchées par la régulation des microARNs [260]. Au sein de la cellule, ils sont impliqués dans la réplication/prolifération cellulaire [266], la différenciation [267] ou encore l'apoptose [268], mais jouent un rôle également à l'échelle de l'organisme. Entre autres, les microARNs jouent un rôle dans la régulation immunitaire comme on l'a vu précédemment, mais aussi l'hématopoïèse [269], l'organofaction [270] et le métabolisme du glucose [271] et des lipides [272]. Dans certaines conditions pathologiques, les microARNs sont impliqués dans la tumorigénèse [273], la défense anti-virale [274], et les maladies cardiovasculaires [275] et neurodégénératives [276] (Pour revue: [277]).

### *I.3.2.3. Spécificité*

Les microARNs ont des rôles et des expressions bien spécifiques. Par exemple le microARN miR-84 inhibe le gène *hbl-1* (*Hunchback-like -1*) uniquement dans les neurones DD (motoneurones dont le corps cellulaire se situe dans la corde ventrale et innervent les muscles dorsaux) chez *C. elegans*. En conséquence, les neurones DD sont remodelés et le

développement est modulé [278]. De même, spécifiquement dans les neurones, miR-124 semble inhibé (directement ou indirectement) par *wrn-1* (*human Werner's syndrome related -1*), codant pour une hélicase catalysant des coupures de l'ADN, et impacterait sur le vieillissement du ver. Un autre exemple illustrant la spécificité des microARNs en terme d'expression et de fonction et à la fois de communication entre types cellulaires est miR-1. Chez *C. elegans*, miR-1 est exprimé dans les muscles et inhibe à la fois l'expression de *mef-2* (*myocyte enhancer factor-2*) et de *unc-29/unc-63*, deux récepteurs à l'acetylcholine nicotinique présents sur les neurones en présynaptique. De ces deux voies distinctes, il résulte une régulation des synapses neuromusculaires [279]. Un autre exemple montrant la communication inter-tissulaire « croisée » est celui de miR-9a et miR-124a. Ils sont chacun exprimés dans un tissu particulier (miR-124a est exprimé dans les neurones tandis que miR-9a est exprimé dans l'épiderme) et leurs cibles sont dans un autre tissu (les cibles de miR-124a sont dans l'épiderme, tandis que celles de miR-9a sont dans les neurones) [280].

Ces spécificités d'action et d'expression existent chez toutes les espèces. Par exemple, miR-124 est impliqué dans la différenciation neuronale chez la souris [281], dans le branchement synaptique chez la drosophile [282], dans la plasticité synaptique chez l'aplysie [283] et dans des fonctions cérébrales chez le rat [284]. Les spécificités dépendent beaucoup de chaque type de microARNs. Chez l'homme, let-7a et let-7b sont présents dans le cerveau, le foie, le cœur et les muscles tandis que miR-9 n'est présent que dans le cerveau [285]. La surexpression de miR-125b et miR-181a dans des lignées cellulaires humaines promeut la génération de neurones à destinée dopaminergique, tandis que miR-181a\* inhibe la différenciation de ce sous-type neuronal et par conséquent la formation de dopamine [286].

L'expression des microARNs change également au cours du temps et le patron d'expression varie que l'on soit au moment du développement, de la vie adulte ou pendant le vieillissement ; les processus régulateurs semblent être identiques [287]. Par exemple, l'expression du microARN let-7 augmente à la fin des stades larvaires chez *C. elegans* et persiste jusqu'à l'âge adulte, tandis que le niveau de lin-41 (*abnormal cell lineage -41*), lui, suit une tendance inverse [288].

### *Quid de la différence entre miARNs et siARNs ?*

D'un point de vue biogénèse, composition chimique, structure, mécanismes d'action et fonction biochimique, miARNs et siARNs sont indifférenciables. Cependant il existe de grandes différences au niveau conservation évolutive et au niveau du type de gènes qu'ils répriment [289]. Notamment, les gènes codant les miARNs ont un locus distinct des gènes codant des protéines, alors que les siARNs dérivent souvent d'ARNs messagers, de transposons, de virus ou d'ADN hétérochromatique. Les miARNs forment des structures en épingles à cheveux tandis que les siARNs sont simplement des duplex d'ARNs, qui sont clivés en de multiples morceaux. Les miARNs sont très bien conservés au cours de l'évolution, alors que les siARNs le sont rarement. Enfin, les siARNs ont tendance à réprimer les loci avoisinants, tandis que les miARNs ont une portée d'action beaucoup plus vaste [289,290].

### *I.3.2.4. Communication inter-cellulaire*

De récentes études ont quantifié la présence de microARNs dans les fluides corporels, en milieu extracellulaire, comme l'urine [291], le sang [292], la salive [293] et le liquide céphalo-rachidien [294]. Contrairement à ce à quoi l'on pourrait s'attendre étant donné la forte quantité d'ARNase clivant les ARNs « errants », les microARNs endogènes sont très stables pendant plusieurs heures tandis que les ARNs synthétiques sont dégradés en moins de 5 secondes [295] (Pour revue : [277]). Même en conditions non-physiologiques, comme des congélations et décongélations répétées, des variations de pH extrêmes ou à température ambiante pour une longue période, les microARNs restent stables [296-298]. Généralement, les microARNs sont couplés à des protéines de transport [299] ou encapsidés dans des exosomes, et sont relâchés par les cellules *via* des transporteurs spécifiques ou par exocytose d'exosomes [300-302]. Un exosome fait en moyenne 50 à 90nm de diamètre et contient un lot unique d'environ 1300 ARNm et plus de 100 microARNs [301]. D'autre part, les microARNs à destinée extracellulaire portent des EXOmotifs « GGAG » dans 75% des cas et leur chargement dans les exosomes est contrôlé par la protéine hnRNPA2B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1) [303]. Une autre méthode de transfert horizontal est le transfert par nanotubes (« tunneling

nanotube») où il a été montré que du matériel protéique, nucléique ou même des organelles pouvaient passer d'une cellule à l'autre par contact direct des cytoplasmes *via* des tunnels de 50 à 200 nm de long formés par des filaments d'actine (Pour revue : [301]). Les microARNs sembleraient passer également par cette voie [304]. Ce transport est dépendant de l'énergie cellulaire car il se fait au contraire du gradient de concentration. Par ailleurs, l'ATP intracellulaire affecte la quantité de microARNs extracellulaires [305]. La sécrétion de ces microvésicules est entre autres régulée par l'influx calcique et la calpaïne [306].

La plupart des études réalisées de nos jours sur les microARNs portent sur leurs rôles dans différents cancers et la facilité de mouvance de ceux-ci amènerait entre autres au phénomène métastatique. Les microARNs sont un formidable outil de communication inter-cellulaire et leur fonction est variable. Il a par exemple été montré que les microARNs contenus dans les exosomes participaient au vieillissement, à la sénescence cellulaire et à l'apoptose [307]-[308]. Plusieurs d'entre eux sont également connus pour médier l'inflammation [309]. Une fois à l'intérieur de la cellule, ils peuvent établir leur action répressive. Cependant il existe une voie non-conventionnelle qui a récemment été décrite : la fixation directe du microARN sur des récepteurs, entre autres des récepteurs Toll-like (TLRs) [308]. Fabbri et ses collaborateurs nous offrent une revue intéressante sur les TLRs comme récepteurs des microARNs en 2012 [310] et suggèrent que :

---

*The identification of circulating miRNAs released by cells within exosomes and the demonstration of their ability to be transferred from 1 cell to another provocatively suggests that miRNAs might act as hormones do. On the basis of this hypothesis, hormonal miRNAs should also have a receptor to which they bind [310].*

---

L'idée qu'un microARN puisse se lier et activer un récepteur est à la fois provocatrice, mais somme toute imaginable. Les TLRs sont connus pour lier des alarmines endogènes ou exogènes et émettre une réponse. Certains d'entre eux comme le TLR3, le TLR7, le TLR8 et le TLR9 sont endosomaux (ou parfois à l'intérieur d'autres organelles comme les lysosomes ou le RE) et reconnaissent des acides nucléiques. Ainsi, le TLR7 et le TLR8 reconnaissent des ARNs simple-brin, le TLR3 reconnaît de l'ARN double-brin et le

TLR9 reconnaît les motifs CpG non méthylés d'ADN. D'un point de vue structurel et conformationnel, il est donc possible que ces récepteurs puissent lier des microARNs endogènes. Effectivement, quelques nouvelles données récentes supportent cette hypothèse. Lehmann et ses collaborateurs en 2012 publient une étude montrant que le TLR7 peut reconnaître le microARN let-7, s'activer et engendrer une dégénérescence neuronale [308]. Les auteurs ont également quantifié let-7b dans le liquide céphalo-rachidien de patients ayant la maladie d'Alzheimer et ont trouvé une augmentation significative de celui-ci [308]. La même année, Fabbri *et al.* montrent que les microARNs miR-21 et miR-29a peuvent lier en tant que ligands les TLR7 murins et TLR8 humains et qu'une sécrétion d'IL-6 (Interleukin-6) et de TNF- $\alpha$  était générée en réponse [311]. Depuis, d'autres études similaires soutenant ces résultats ont été publiées [312,313]. Par exemple les cellules NK (Natural Killer) humaines ou murines peuvent détecter les microARNs miR-15b et miR-122 dans le milieu extracellulaire *via* l'activation de la voie de signalisation du TLR1 [314]. Le type d'activation, qu'elle soit directe – *via* une liaison au récepteur - ou indirecte – par modulation des composants intracellulaires – n'a pas été démontrée. Outre une liaison directe entre TLR et microARN, ces derniers peuvent aussi influencer les voies de signalisation intracellulaires des TLRs, soit de manière directe soit par liaison au 3'UTR des ARNm de ces voies (Pour revue : [315]). Notamment les microARNs miR-21, miR-146a et miR-155 ont été bien étudiés à ce sujet (Pour revue : [316]).

Une très belle revue nous est offerte par Paschon et ses collaborateurs en avril 2015 sur la relation entre exosomes, microARNs et TLRs [190]. Il avancent que :

---

*Considering the role of TLRs and assuming that exosomes carry miRNAs, we can hypothesise that miRNAs are signaling molecules with important functions in nervous system diseases [190].*

---

Et que :

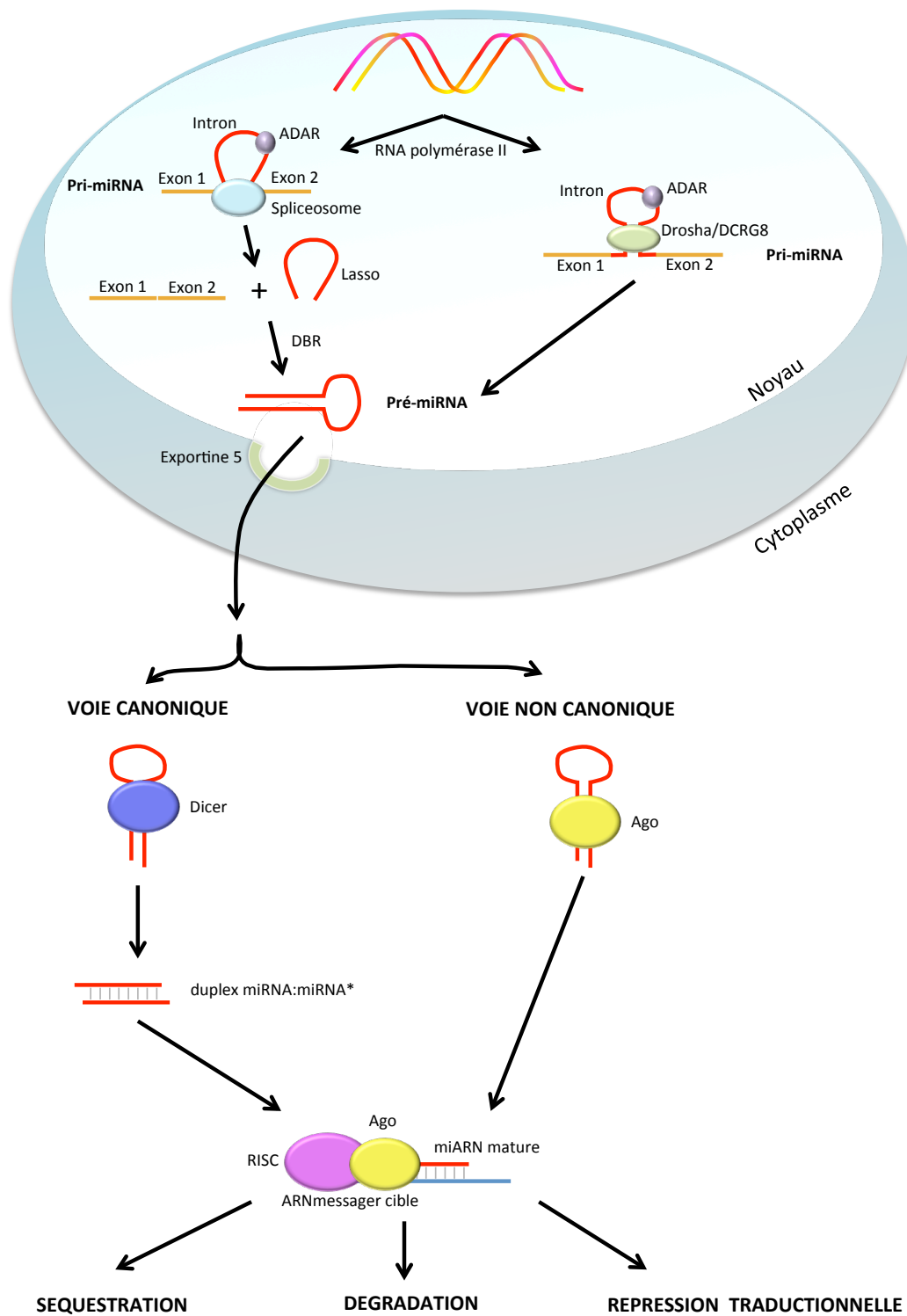
---

*Short neuroinflammatory responses are considered to be neuroprotective and may contribute neuronal development; however, when persisting they result in neurodegeneration [120]. In this regard, crucial functions may be attributed to endogenous miRNAs as ligands of TLR-promotion of neuroinflammation, as these are responsible for fine-tuning activity levels of TLRs and subsequent kinetics of innate immune response [190].*

---

#### *I.3.2.5. Biogénèse*

La voie de biogénèse des microARNs est un peu complexe et diffère quelque peu selon les espèces. De manière générale, l'ARN polymérase II va synthétiser un pri-miARN à partir d'une région intergénique, intro/exogénique ou polycistronique. Ce pri-miRNA peut être maturé par l'enzyme ADR (ou ADAR) (Adenosine deaminase acting on RNA) qui va changer des adénosines en inosines (A-to-I enzyme) [317]. Dans la plupart des cas, la région intronique du pri-miARN va adopter une structure en épingle à cheveux, où viendra se fixer le complexe Drosha/DCRG8 (DiGeorge syndrome chromosomal region 8) [318] (Figure 14). Ce complexe va cliver le pri-miARN et le transformer en pré-miARN, le tout au niveau du noyau. Si l'intron du pri-miARN a une forme de lasso et est entouré par deux exons, la voie de biogénèse suivra une voie non-canonique, où l'enzyme DBR (Lariat debranching enzyme) clivera la structure en lasso pour former un pré-miARN [319]. Un complexe protéique autour de l'exportine-5 et du pré-miARN permettra à celui-ci une exportation du noyau vers le cytoplasme [320]. Une fois dans ce compartiment, la plupart du temps le pré-miARN est pris en charge par l'enzyme Dicer afin d'être clivé en ARN double brin (duplex miRNA:miRNA\*) séparant ainsi la boucle de l'épingle à cheveux (Figure 14), c'est la voie canonique [321]. Puis un complexe entre une protéine argonaute Ago et le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) clive ce double brin et prend en charge le simple brin qui lui servira de guide vers des ARNm cibles [322]. Dans certains cas, à sa sortie du noyau, le pré-miARN entame une voie, encore une fois, non canonique, indépendante de Dicer [323]. Des argonautes s'y fixent, le clivent puis avec le complexe RISC entament la même procédure de destruction, de séquestration ou de répression traductionnelle décrite précédemment (Figure 14).





**Figure 14 : Biogénèse des microARNs.** La RNA polymérase II dans un premier temps transcrit le gène en pri-miRNA. Deux exons sont rapprochés formant une boucle intronique en épingle à cheveux où se fixe le complexe DROSHA/DCRG8 pour former un pré-miRNA (voie de droite). Dans le cas d'un intron en forme de lasso (voie de gauche), un spliceosome vient se fixer à ce niveau et l'enzyme DBR le clive en pré-miRNA. L'enzyme ADAR peut éditer des pri-miRNAs en changeant des adénosines en inosines. Le miRNA généré passe dans le cytoplasme *via* l'exportine-5. Il peut suivre une voie canonique où l'enzyme Dicer clive la boucle et forme un double brin de miRNA et son complémentaire. Un complexe RISC et des argonautes s'y attachent pour former un miRNA mature qui peut être séquestré, dégradé ou entraîner une répression traductionnelle. Une voie non-canonique peut être mise en place où l'argonaute fixe directement le pré-miRNA et entraîne sa maturation. Abréviations : ADAR, Adenosine deaminase acting on RNA; DBR, Lariat debranching enzyme ; DCRG8, DiGeorge syndrome chromosomal region 8 ; RISC, RNA-induced silencing complex.

---

### **I.3.3. Rôle des microARNs dans la sclérose latérale amyotrophique**

Depuis leur découverte et aux vues de leurs propriétés, le rôle que peuvent jouer les microARNs en conditions pathologiques a été fortement investigué, et ce particulièrement dans le domaine du cancer. Que ce soit pour leur régulation dans les processus tumoraux ou pour leur rôle dans l'invasion tumorale et métastatique, les publications ne cessent d'apporter de nouvelles réponses. Par exemple le microARN let-7 est un anti-cancéreux dû à ses propriétés de répression oncogénique des gènes *ras* (*Rat sarcoma*) [324] tandis que miR-21 serait pro-apoptotique dans le cancer du poumon [325].

Les microARNs sont aussi impliqués dans d'autres pathologies, comme les infections virales, les maladies liées à une dérégulation immunitaire ainsi que des maladies neurodégénératives (Pour revues : [190,326]).

Puisque les microARNs sont impliqués au niveau synaptique, il n'est pas étonnant qu'ils soient liés à des neuropathies. Par exemple, miR-218 est enrichi dans les motoneurones embryonnaires de souris ainsi que dans leur moelle-épineuse et est indétectable dans les autres tissus. Les souris « knock-out » pour *mir-218* ont un phénotype proche de celles qui ne possèdent pas d'acétylcholine et donc une transmission synaptique manquante : akinésie, faible ou pas de réponse aux stimuli nociceptifs... miR-218 serait impliqué, d'après les auteurs, dans la régulation synaptique, l'excitabilité membranaire et la

survie neuronale. Il est intéressant de noter que l'une des cibles de miR-218 est le gène du récepteur au glutamate EAAT2 (Excitotoxic amino acid transporter 2), modulé par le riluzole dans la SLA [327]. Un autre exemple : les microARNs miR-133b et miR-206 sont présents en grand nombre à la membrane post-synaptique des jonctions neuromusculaires. Leur quantité augmente à la suite d'une lésion axonale [328].

La première évidence d'un lien entre les microARNs et une atteinte neurologique a été apportée en 2006 dans un modèle de neurodégénérescence induite par une expansion de polyglutamine due à une répétition de CAG chez la drosophile [329]. Puis que ce soit comme une dérégulation globale de microARNs, pour une poignée d'entre eux ou pour un individu unique, les études se sont enchaînées liant microARNs et maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, démence fronto-temporale, maladie d'Huntington, ataxie spino-cérébelleuse, etc (Pour revues : [330,331]).

En 2012 arrive la première évidence d'une signature de microARNs propres aux patients ayant une SLA sporadique, au moins dans le tissu leucocytaire. Précisément, 8 microRNAs sur 911 analysés étaient sur- ou sous-exprimés par rapport aux patients sains [170]. Depuis, foule d'indices montre l'implication des microARNs dans la SLA.

#### *I.3.3.1. Liens entre microARNs, leur biogénèse et les protéines liées à la sclérose latérale amyotrophique*

Il existe manifestement une relation entre la biogénèse des microARNs et la SLA. Commençons par l'enzyme ADAR, qui comme nous l'avons mentionné précédemment permet un épissage du microARN. Des souris « knock-out » pour le gène *adar2* meurent par mort des motoneurones et plus de la moitié des patients ayant une SLA sporadique montrent une activité réduite voire une inactivité de ADAR2 et conséquemment un mauvais épissage des ARNs [332]. Chez *C. elegans*, les mutations dans les gènes codant pour les orthologues de ADAR, *adr-1* et *adr-2*, ont une longévité écourtée [333]. De plus, si des motoneurones sont dépourvus de cette enzyme, il y est noté une mauvaise localisation de la protéine TDP-43 [145,334]. De même chez de jeunes souris, ADAR2 et TDP-43 co-localisent dans le noyau des neurones mais chez des souris âgées qui voient TDP-43 se délocaliser

dans le cytoplasme, la quantité d'enzyme ADAR2 diminue dans le noyau ; son activité, elle, reste la même [335].

La protéine TDP-43 semble se lier directement aux pri-miARNs afin de faciliter la production de pré-miARNs (Pour revue : [336]). Une étude chez la levure a permis, en analysant son génome, d'identifier des protéines modifiant la toxicité de TDP-43. Le plus grand suppresseur de la protéotoxicité induite par TDP-43 s'est révélé être l'enzyme DBR-1, qui permet la section du lasso des pri-microARNs. Sa suppression entraîne, de manière inattendue, une accumulation de lasso introniques dans le cytoplasme, ce qui séquestrerait TDP-43, réduisant ainsi sa toxicité cytoplasmique [319].

En ce qui concerne Drosha et Dicer, de manière intéressante, TDP-43 interagit directement avec ces deux protéines, et ce rapprochement est indispensable au bon fonctionnement neuronal [38]. Une mutation dans le gène de TDP-43 mène entre autres à une instabilité de ces protéines [337].

FUS se lie directement à des pri-miARNs spécifiques dans le noyau cellulaire, et cette interaction est nécessaire au recrutement de Drosha. Des souris « knock-out » pour *dicer* ont des symptômes s'apparentant à ceux de la SLA. En effet, l'inhibition de Dicer dans les motoneurones cholinergiques entraîne une détérioration de l'activité locomotrice relative à une atrophie musculaire et une mort neuronale [338]. TAF15, une autre protéine liée à la SLA liant les ARNs, est également impliquée dans la voie des microARNs [339].

Peu de choses sont connues sur une interaction avec les argonautes. Une publication sur la drosophile a montré un lien entre la protéine ATAXIN-2, impliquée dans la SLA (Tableau 1), et AGO1 [340].

#### *I.3.3.2. Dérégulation globale des microARNs dans la sclérose latérale amyotrophique*

De manière générale, une déplétion de TDP-43 dans des lignées cellulaires ou des tissus humains mène à une modulation de l'expression de certains microARNs. Par exemple, Buratti *et al.* montrent en 2012 que sur un panel de 67 microARNs, 8 étaient sur- ou sous-exprimés suite à une inhibition de l'expression de TDP-43 par siARNs dans les lignées cellulaires SHSY5Y (cellules dérivées d'un neuroblastome humain), HeLa (cellules dérivées d'un adénocarcinome humain) et Hep-3B (cellules hépatiques humaines) (Annexe 2 ) [264].

De même, dans un modèle de cellules souches pluripotentes induites dérivées de neurones de patients ayant une mutation A90V ou M337V dans le gène de TDP-43, il est observé une diminution de la quantité de miR-9 [341]. La même année, Freischmidt et ses collaborateurs ont quantifié une dizaine de microARNs connus pour se lier directement à TDP-43 dans le sérum et le liquide céphalorachidien de patients ayant une SLA sporadique. Ils seront également quantifiés dans des cellules dérivées de cellules lymphoblastoïdes de patients ayant une mutation dans *TARDBP*, *FUS*, *SOD1*, *C9ORF72* ou avec une SLA sporadique (Annexe 2) [294]. Des souris dans lesquelles nous avons réprimé *FUS*, ont un profil d'expression de certains microARNs altéré [342].

De nouveaux microARNs continuent sans cesse d'être découverts pour leur dérégulation dans la SLA [343-348] (Annexe 2). Néanmoins, les contrôles endogènes sensés être invariables changent d'une étude à l'autre ainsi que les méthodes d'analyses et les tests statistiques. Il est donc difficile de comparer les résultats et d'avoir une totale confiance, surtout quand le « fold change » (c'est à dire le nombre de fois qu'un microARN varie par rapport au contrôle) est bas. Parfois les études se recoupent et montrent une même tendance pour un même microARN (comme let-7b qui diminuerait [264,294,349] ou miR-206 qui augmenterait dans la SLA [348,350,351]).

D'une manière générale, près de 500 microARNs ont été découverts dérégulés à l'heure actuelle dans la SLA, que ce soit chez des patients ou chez des modèles de SLA.

### L'hypothèse d'une baisse générale des microARNs

Plusieurs évidences montrent que d'une manière générale, la quantité de microARNs produits est à la baisse dans le cas d'un stress cellulaire ainsi que dans des cas de mutations relatives à la SLA. Entre autres les quantifications relatives de Freischmidt, Dobrowolny, Benigni et Figueroa-Romero appuient fortement sur l'observation d'une baisse globale des microARNs chez les patients ayant la SLA ou dans des modèles murins [294,346,347,349,352]. De plus, Emde *et al.* ont montré que d'une manière générale la quantité relative de microARNs matures par rapport aux pré-miARNs est diminuée. Néanmoins la quantification est réalisée sur des extraits d'ARNs de neurones, excluant les microARNs présents dans le milieu extracellulaire. Ainsi, la diminution de microARNs

matures observée pourrait être due à une relâche accrue de ceux-ci dans le milieu extracellulaire plutôt qu'à une diminution de leur biogénèse. Les seuls microARNs réellement quantifiés dans des motoneurons de patients SLA sont miR-9 et miR-124, dont on observe une diminution dans le cas pathologique. Cependant, les auteurs ont montré que l'activité de Dicer était réduite suite à un stress cellulaire ou à une sur-expression de gènes mutants relatifs à la SLA [353] et, en conséquence, la quantité de microARNs était diminué. De plus, l'ajout d'une drogue (l'enoxacine) augmentant la biogénèse des microARNs serait bénéfique pour les fonctions neuromusculaires de modèles de souris SLA.

#### *I.3.3.3. Action de microARNs individuels dans les processus neurodégénératifs de la sclérose latérale amyotrophique*

En dehors des études ciblant une large cohorte de microARNs, certains auteurs se sont focalisés sur un ou quelques microARNs en particulier (Annexe 2). De manière générale, le microARN miR-218 semble impliqué dans le branchement nerveux intramusculaire et les jonctions neuromusculaires menant, en cas d'absence, à une neurodégénérescence [327]. miR-206, lui aussi, a une action neuromusculaire [350] et a été montré pour être surexprimé chez un modèle de souris SOD1 ainsi que dans le sérum de patients ayant la SLA [348,350,351]. Dans le modèle de souris et de rat SOD1, l'administration en intraventriculaire d'un inhibiteur de miR-155 prolonge leur survie [344]. Aussi, dans la moelle-épineuse de souris SOD1, on retrouve une diminution du microARN miR-124a comparé aux souris contrôles [354] et une augmentation de miR-29b dans le cortex [355]. Parallèlement, une augmentation de miR-125b est observée dans la moelle-épineuse de souris SOD1, entraînant une modulation de NF- $\kappa$ B *via* la protéine A20 [356]. Des études dans un modèle de SLA chez drosophile ont apporté l'évidence d'une diminution du microARN miR-9a lors d'une mutation du gène codant pour TDP-43 [357]. Ainsi, d'après les auteurs, TDP-43 agirait à travers miR-9a afin de contrôler la spécification des organes sensoriels de la drosophile. Enfin comme dernier exemple, le microARN miR-338 est l'un des plus étudié concernant la SLA. Son brin mature 3P est clairement en augmentation chez les patients ayant la SLA, que ce soit dans le sang, le sérum, le LCR, la moelle-épineuse, le cortex frontal ou le cortex moteur ainsi que dans les leucocytes

[170,358-360]. En ce qui concerne l'autre brin mature, 5P, les études chez l'Homme sont moins claires, certains voient une diminution dans la moelle-épinière en post-mortem [347] quand d'autres voient une légère tendance à la hausse dans le cortex moteur [359].

#### **I.3.4. let-7 : un microARN crucial dans la sclérose latérale amyotrophique**

Tout d'abord, let-7 (lethal-7) est très conservé entre les espèces (Figure 15A), particulièrement la séquence 5P. En rouge a été indiquée la séquence « seed » ultra-conservée. Dans ce tableau n'a été représenté que let-7a à travers les espèces mais il existe souvent d'autres sous-types, comme nous pouvons le voir chez l'Homme (Figure 15B) où nous retrouvons 3 sous-types de let-7a et 2 let-7f, qui varient en fonction de leur séquence 3P, puis let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7g et let-7i. Les séquences 5P ont toutes la même séquence «seed» GAGGUAG, que l'on retrouve par ailleurs entre les espèces également (Figure 15A-B) et ne diffèrent entre elles que par quelques nucléotides indiqués en bleu (Figure 15B). Finalement, à titre illustratif, la structure secondaire du pré-microARN let-7 de *C. elegans* a été illustrée (Figure 15C). Les couleurs représentent les probabilités conformationnelles, avec en rouge une probabilité de 100% et les couleurs tirant vers le bleu donnent une probabilité plus faible. Cette conformation a été réalisée *via* le logiciel *RNAfold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>), qui donne les structures thermodynamiquement stables et faibles en énergie. Il existe également une « famille let-7 ». Chez *C. elegans*, les membres de cette famille sont let-7, miR-48, miR-84 et miR-291. D'un point de vue fonctionnel, ils agissent en synergie, notamment pendant le développement [361]. Au niveau des rôles biologiques, let-7 est impliqué dans l'embryogénèse et le développement cérébral, mais à la fois présent dans tous les types tissulaires, et comme nous le mentionnions précédemment, let-7 est un puissant suppresseur de tumeur en inhibant des oncogènes.

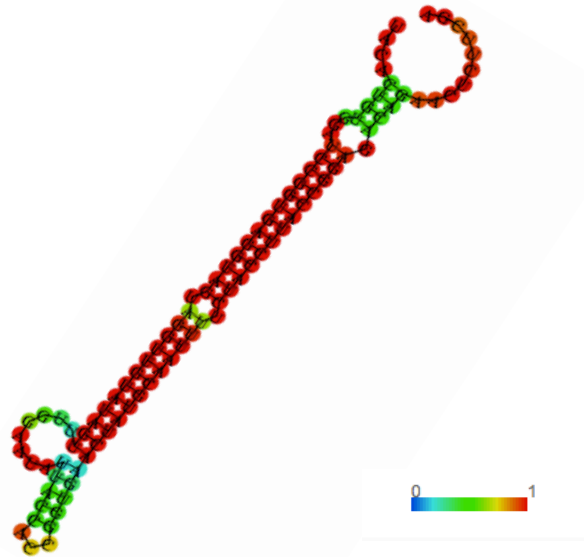
A

Espèce	miRNA	5P	3P
<i>Anopheles gambiae</i>	<i>let-7a</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u	-
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	<i>let-7a</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u	-
<i>Xenopus tropicalis</i>	<i>let-7a</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	-
<i>Gallus Gallus</i>	<i>let-7a</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	-
<i>Fugu rubripes</i>	<i>let-7a</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	-
<i>Sus scrofa</i>	<i>let-7a</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	-
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>let-7a</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	-
<i>Bos taurus</i>	<i>let-7a</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	-
<i>Monodelphis domestica</i>	<i>let-7a</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	-
<i>Schmidtea mediterranea</i>	<i>let-7a-1</i>	u g a g g u a g a a u g u u g g a u g a c u	g c u g u u c a a u u u u c u g c c u u u a a
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>let-7</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	c u a u g c a a u u u u c u a c c u u a c c
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>let-7a-1</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	c u a u a c a a u c u a c u g u c u u u c c
<i>Mus musculus</i>	<i>let-7a-1</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	c u a u a c a a u c u a c u g u c u u u c c
<i>Homo sapiens</i>	<i>let-7a-1</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	c u a u a c a a u c u a c u g u c u u u c

B

miRNA	Séquence 5P	Séquence 3P
<i>hsa-let-7a1</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	c u a u a c a a u c u a c u g u c u u u c
<i>hsa-let-7a2</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	c u g u a c a g c c u c c u a g c u u u c c
<i>hsa-let-7a3</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g u u	c u a u a c a a u c u a c u g u c u u u c
<i>hsa-let-7b</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u g u g u u	c u a u a c a a c c u a c u g c c u u c c c
<i>hsa-let-7c</i>	u g a g g u a g u a g g u u g u a u a g g u u	c u g u a c a a c c u u c u a g c u u u c c
<i>hsa-let-7d</i>	a g a g g u a g u a g g u u g c a u a g u u	c u a u a c g a c c u g c u g c c u u u c u
<i>hsa-let-7e</i>	u g a g g u a g g a g g u u g u a u a g u u	c u a u a c g g c c u c c u a g c u u u c c
<i>hsa-let-7f1</i>	u g a g g u a g u a g a u u g u a u a g u u	c u a u a c a a u c u a u u g c c u u c c c
<i>hsa-let-7f2</i>	u g a g g u a g u a g a u u g u a u a g u u	c u a u a c a g u c u a c u g u c u u u c c
<i>hsa-let-7g</i>	u g a g g u a g u a g u u u g u a c a g u u	c u g u a c a g g c c a c u g c c u u g c
<i>hsa-let-7i</i>	u g a g g u a g u a g u u u g u g c u g u u	c u g c g c a a g c u a c u g c c u u g c u

C



**Figure 15 : Structures primaires et secondaires de let-7.** A. Tableau représentant les séquences 5P et 3P de let-7a à travers les espèces. La séquence « seed » est représentée en rouge. Séquences empruntées au site <http://www.mirbase.org>. B. Les séquences 5P et 3P

des sous-types de let-7 chez l'Homme (*hsa*, *Homo sapiens*) sont représentées. La séquence « seed » est représentée en rouge et les nucléotides variables d'une séquence à l'autre sont indiqués en bleu. C. Structure secondaire du pré-microARN let-7 chez *C. elegans* selon des principes thermodynamiquement stables et faibles en énergie. Du bleu au rouge correspond la probabilité de conformation de 0 à 1, 1 étant la plus haute probabilité. Réalisé à partir du logiciel RNAfold <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>.

---

Parmi les microARNs précédemment cités et investigués dans la SLA et les neurodégénérescences en général, let-7 a une place privilégiée. Nous nous sommes focalisés sur lui pour diverses raisons. D'abord, une dérégulation notable de ces différents sous-types tels que let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7g et let-7i chez l'homme ou chez la souris dans le cas pathologique de SLA [264,294,346,347,349,362]. Let-7 est sécrété dans le milieu extracellulaire, par exemple *via* des exosomes [363]. A l'instar d'autres microARNs individuels dérégulés dans la neurodégénérescence tels que miR-124 [364] et miR-8 [365], let-7 a été montré pour conduire à la neurodégénérescence par l'activation du TLR7 [308]. Une autre étude vient appuyer cette découverte, puisque Park et ses collaborateurs ont montré que let-7b active des neurones nocicepteurs par liaison directe avec le TRL7, et régulant le canal cationique TRPA1 (Transient receptor potential A1) [366]. Dans une étude menée sur 90 microARNs chez *C. elegans*, 10 ont été trouvés pour être potentiellement impliqués dans la régénérescence axonale, parmi lesquels *let-7* est exprimé dans certains types neuronaux [288]. *let-7* est exprimé à la fin du quatrième stade larvaire chez *C. elegans* et durant la vie adulte. Il inhibe le microARN lin-41 qui inhibe à son tour lin-29 pour empêcher la régénérescence axonale de se faire correctement en cas de blessure [288]. Des manipulations génétiques menant à des pertes de fonctions de let-7 nous permettent d'observer un cycle cellulaire dérégulé et une maturation incomplète des jonctions neuromusculaires et donc une musculature et une locomotion anormale chez la drosophile [367].

Une autre raison pour laquelle il est intéressant de se pencher plus en profondeur sur let-7 est son rôle dans l'inflammation. Comme nous avons vu précédemment, il y a une composante inflammatoire indiscutable dans la SLA [163-165]. Par exemple, let-7 joue sur la balance phénotypique M1-M2 des macrophages/microglies (M1 étant globalement pro-



inflammatoire et M2 plutôt neuroprotecteur). Il a été montré qu'une sur-expression de let-7a dans une lignée murine microgliale BV2 mène à une augmentation des facteurs anti-inflammatoires et protège les cellules des dommages apoptotiques. En conditions pro-inflammatoires, la microglie exprime plus de let-7a de façon à adopter un phénotype M2 neuroprotecteur [368].

Enfin, let-7 a été lié à la voie TIR-1 chez *C. elegans*, pendant le développement ou en condition infectieuse, non pas comme une molécule signalale, mais comme un répresseur de l'expression des protéines de la voie des MAPKs [169]. De plus, let-7 aurait un rôle sur la progression du vieillissement en interagissant fonctionnellement et physiquement avec des gènes jouant sur la sénescence [369].

#### **I.4.OBJECTIFS SPÉCIFIQUES ET HYPOTHÈSES**

L'objectif de ma thèse a été de comprendre le rôle du système immunitaire inné dans un modèle de sclérose latérale amyotrophique chez *C. elegans*. Puisque la voie Sarm-1 est impliquée dans la mort cellulaire et la dégénérescence axonale, nous avons d'abord émis l'hypothèse que cette voie était activée dans la SLA. Pour vérifier cela – au moins dans deux modèles de SLA chez *C. elegans* - et étant donné que la voie immunitaire Sarm-1 est très conservée phylogénétiquement, nous avons utilisé une approche génétique afin de voir si l'absence de protéine fonctionnelle aurait un impact sur la protéotoxicité induite par les protéines humaines mutées TDP-43 ou FUS préalablement injectées et intégrées dans le génome du ver. Ces protéines étant exprimées dans les motoneurones GABAergiques, il était aisé de suivre la paralysie et la neurodégénérescence *via* un marqueur fluorescent dans ces neurones (Figure 5). Nous avons également voulu vérifier l'implication de l'entière de la voie Sarm-1/TIR-1 dans le processus de neurodégénérescence. L'activation de cette voie a également pu être suivie grâce à un rapporteur fluorescent, *nlp-29p::GFP*, normalement exprimé en condition infectieuse. NLP-29 est présente uniquement dans l'intestin et l'hypoderme du ver. Ainsi, l'observation d'une activation de la voie TIR-1 et donc d'une expression de NLP-29, dans nos conditions où TDP-43 et FUS ne sont exprimées que dans les neurones GABAergiques, relève d'un phénomène de signalisation inter-

cellulaire. Afin d'éviter de reposer nos résultats sur un rapporteur unique, nous avons quantifié par RT-semi-qPCR d'autres rapporteurs de l'activation de la voie TIR-1 chez le ver, à savoir F08G5.6, F49F1.6 et F24B8.5. Par ailleurs, le blocage des processus exocytaires nous a permis de vérifier cette hypothèse. Pour finir, afin d'appuyer nos résultats et leur donner une potentielle valeur thérapeutique, nous avons usé de processus pharmacologiques en inhibant une des protéines de la voie TIR-1, plus précisément PMK-1, et vérifier la protéotoxicité de TDP-43 et FUS. Au moment de publier nos résultats, une étude a montré que le récepteur DCAR-1 (DihydroCaffeic Acid Receptor -1) se trouvait en amont de la voie TIR-1 chez *C. elegans*. Nous avons donc testé si ce récepteur pouvait être partie intégrante de notre système menant à la neurodégénérescence (Manuscrit 1).

A la suite de cette première publication restaient deux questions primordiales :

1. Quel peut être le signal inter-cellulaire relâché par les motoneurones GABAergiques (en ayant conscience qu'il peut s'agir d'un ensemble de molécules) ?
2. Et quel est le récepteur impliqué dans la réception du signal ?

Pour la deuxième partie de ma thèse, nous avons donc cherché à répondre à ces deux questions puisqu'il semblerait que *C. elegans* soit un bon outil pour étudier le phénomène de « non-cell autonomous » (i.e. une mutation génétique dans une cellule affecte phénotypiquement d'autre cellules) [370]. Grâce à une souche de ver doublement transgénique, *unc-17p::GFP*; *unc-47p::mCherry*, c'est-à-dire ayant les neurones cholinergiques fluorescents verts et les neurones GABAergiques fluorescents rouges, nous avons étudié la neurodégénérescence induite par la protéine humaine mutée TDP-43<sup>A315T</sup> exprimée uniquement dans les motoneurones GABAergiques. Nous avons préalablement vérifié que la dégénérescence des neurones cholinergiques était spécifique à la protéotoxicité de TDP-43<sup>A315T</sup> et non à un dommage des neurones GABAergiques eux-mêmes. Nous avons par la suite cherché à savoir si les microARNs étaient impliqués dans le processus de paralysie, de neurodégénérescence et de diffusion trans-cellulaire par l'utilisation de mutants ou par une répression par ARNi de Dicer, Drosha et Ago2. Puis, nous avons quantifié let-7 chez des vers sauvages et dans la souche possédant TDP-43<sup>A315T</sup> pour

observer une éventuelle fluctuation. Nous avons aussi utilisé un mutant pour *let-7* afin de voir si la paralysie et la neurodégénérescence induite par TDP-43<sup>A315T</sup> étaient réduites ou non. Naturellement, nous sommes retournés à l'utilisation du rapporteur fluorescent *nlp-29p::GFP* afin de voir si la voie TIR-1, activée par TDP-43<sup>A315T</sup>, était modulée en absence de *let-7*. Il était utile de regarder si l'activation de TIR-1 était spécifique à notre modèle de SLA chez *C. elegans* ou si d'autres modèles de neurodégénérescence pouvaient passer par cette voie. Nous avons également investigué auprès des récepteurs potentiellement impliqués. Puisque l'absence de récepteurs DCAR-1 fonctionnels ne modifie pas la neurodégénérescence induite par TDP-43<sup>A315T</sup>, nous avons utilisé un mutant pour *tol-1*, un gène codant pour le seul représentant des TLRs chez *C. elegans*. Nous avons observé que la protéine TOL-1, bien que décrite pour être principalement développementale, est nécessaire à la protéotoxicité de TDP-43<sup>A315T</sup>. La relation directe entre TOL-1 et *let-7* est difficile à montrer sachant que nous ne disposons pas d'anticorps contre TOL-1 afin d'effectuer une immunoprécipitation. Nous nous sommes tournés vers des prédictions biostatistiques en utilisant des interfaces calculant la probabilité que *let-7* se lie à TOL-1 et à quels sites potentiels (Manuscrit 2). Le but de ces travaux étant de trouver de nouveaux axes de recherche et de nouvelles cibles thérapeutiques pour la SLA et les maladies neurodégénératives en général.

## **II. Résultats**

### **II.1. MANUSCRIT 1 : NEURODEGENERATION IN *C. elegans* MODELS OF ALS REQUIRES TIR-1/SARM1 IMMUNE PATHWAY ACTIVATION IN NEURONS.**

Julie Vérièpe<sup>1,2</sup>, Lucretse Fossouo<sup>1</sup>, and J. Alex Parker<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>CRCHUM, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada,

<sup>3</sup>Département de neurosciences, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Article publié dans Nature Communications, 2015 June 10; 6:7319.

#### **Contributions :**

J.V. a fait les expériences, analysé et assemblé les données, contribué à l'élaboration du projet et à l'écriture du manuscrit.

L.F. a contribué à l'obtention de certaines souches et a fait certaines expériences d'ARNi et des tests de paralysie.

J.A.P. a dirigé le projet et participé à l'écriture du manuscrit.

## **ABSTRACT**

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease thought to employ cell non-autonomous mechanisms where neuronal injury engages immune responses to influence disease progression. Here we show that the expression of mutant proteins causative for ALS in *Caenorhabditis elegans* motor neurons induces an innate immune response via TIR-1/Sarm1. Loss of function mutations in *tir-1*, associated downstream kinases, and the transcription factor *atf-7* all suppress motor neuron degeneration. The neurosecretory proteins UNC-13 and UNC-31 are required for induction of the immune response as well as the degeneration of motor neurons. The human orthologue of UNC-13, UNC13A, has been identified as a genetic modifier of survival in ALS, and we provide functional evidence of UNC-13/UNC13A in regulating motor neuron degeneration. We propose that the innate immune system reacts to the presence of mutant proteins as a contagion, recruiting a pathogen resistance response that is ultimately harmful and drives progressive neurodegeneration.

## INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by a progressive and selective loss of motor neurons in the brain and spinal cord<sup>1</sup>. At the cellular and molecular levels, numerous mechanisms have been associated with ALS including impaired axonal transport, mitochondrial dysfunction, pathological induction of the integrated stress response and neuroinflammation<sup>2</sup>. Over two dozen genes are associated with ALS, including genes encoding the DNA/RNA-binding proteins TAR DNA Binding Protein 43 (TDP-43) and fused in sarcoma (FUS)<sup>3</sup>. A great challenge remains in functionally linking these ALS mutations to pathogenic mechanisms, and with the recent discovery of so many new genes comes the need to develop experimentally tractable models<sup>4</sup>.

As many genes linked to ALS are evolutionarily conserved, we turned to the nematode *Caenorhaditis elegans* to develop in vivo models of TDP-43 and FUS motor neuron degeneration<sup>5</sup>. We have used these *C. elegans* ALS models to investigate cellular mechanisms underlying motor neuron degeneration<sup>6-8</sup>, as well as for drug discovery<sup>9-11</sup>. Given the importance of neuroinflammation to the pathological progression of neurodegeneration, including for ALS<sup>12</sup>, we set out to investigate fundamental immune response signalling in our ALS models.

*C. elegans* possesses an innate immune system that is induced in response to viral or microbial infection<sup>13</sup>. One antimicrobial defence pathway in *C. elegans* consists of *tir-1*, encoding a Toll Interleukin 1 Receptor (TIR) domain adaptor protein, which is orthologous to human Sarm1 (sterile alpha and armadillo repeats)<sup>14</sup>, as well as the downstream kinases NSY-1, SEK-1 and PMK-1<sup>15</sup>. Microbial infection triggers this signalling pathway to activate the transcription factor ATF-7, leading to increased transcription of numerous genes including one encoding the antimicrobial peptide NLP-29<sup>16</sup> (neuropeptide-like protein 29).

*C. elegans* is an established model for investigating conserved genetic pathways that regulate the cellular stress response and neurodegeneration<sup>4</sup>. In this study, using transgenic *C. elegans* models for ALS we investigate the role of the innate immune response

and discover that the TIR-1 pathway regulates motor neuron degeneration caused by mutant TDP-43 and FUS proteins.

## RESULTS

### **Mutant ALS proteins activate an innate immune response.**

We created *C. elegans* strains expressing full-length, untagged, human TDP-43 or FUS proteins in motor neurons. Transgenic *C. elegans* expressing mutant TDP-43 or FUS in their motor neurons show age-dependent motility defects leading to paralysis and motor neuron degeneration at a rate significantly higher than wild-type TDP-43 or FUS control strains<sup>5</sup>. These behavioural and degenerative phenotypes typically develop over 7–12 days of adulthood for worms cultured on petri plates. To investigate whether mutant TDP-43 or FUS proteins engaged the innate immune response, we crossed our transgenic ALS models with a transgenic strain expressing the reporter *nlp-29::GFP*. *nlp-29* encodes an antimicrobial, neuropeptide-like protein that is expressed in hypodermal and intestinal tissue (Supplementary Fig. 1) following fungal infection, physical injury or osmotic stress<sup>17</sup>. Thus, the *nlp-29::GFP* reporter brightly fluoresces when the animal is subjected to infectious and/or wounding conditions<sup>18,19</sup>. At day 9 of adulthood we observed that mutant TDP-43<sup>A315T</sup> or FUS<sup>S57A</sup> transgenics, but not wild type TDP-43 or FUS control strains, caused a significant increase in *nlp-29::GFP* expression (Fig. 1a–d).

We extended our investigation of innate immune response signalling by examining the expression of several additional genes. The genes F08G5.6, F49F1.6 and T24B8.5 function within the *tir-1* pathway and show increased expression under infection conditions<sup>20,21</sup>. We observed increased expression of these genes in animals expressing mutant TDP-43 proteins compared with controls (Fig. 1e). These data demonstrate that the expression of mutant ALS proteins in motor neurons induces the expression of genes associated with the innate immune response *in vivo*.

As *tir-1* is required for the induction of *nlp-29* expression during infection<sup>16</sup>, we wondered whether *tir-1* was also required for *nlp-29::GFP* expression by mutant ALS

proteins. Using the null mutation *tir-1(qd4)* we constructed a TDP-43<sup>A315T</sup>; nlp-29p::GFP; *tir-1(qd4)* strain and observed it had less fluorescence compared with a TDP-43<sup>A315T</sup>; nlp-29::GFP strain (Fig. 1f), suggesting the induction of the immune response by mutant proteins partially requires the *tir-1* pathway.

Next, we wondered whether the induction of nlp-29::GFP was specific to TDP-43 or FUS, or perhaps could be triggered by other misfolded proteins. We created strains to model polyglutamine toxicity by expressing mutant human ATXN3 in the worm's motor neurons. Machado-Joseph disease is caused by a trinucleotide CAG repeat expansion (coding for glutamine) in ATXN3<sup>22</sup>. We created strains expressing human ataxin-3 with either 14 polyglutamine repeats (wild-type allele) or 89 polyglutamine repeats (disease allele). These same mutant polyQ89 ataxin-3 proteins have been previously shown to misfold and cause neurodegeneration in cell culture and *Drosophila* models<sup>23</sup>. These ataxin-3 *C. elegans* strains were then crossed with the nlp-29::GFP reporter and we observed that the polyQ14 or polyQ89 transgenes did not induce nlp-29::GFP expression (Supplementary Fig. 2). These data demonstrate that ALS-associated mutations in TDP-43 and FUS specifically induce nlp-29::GFP expression, suggesting they employ pathogenic mechanisms distinct from polyglutamine toxicity.

The endoplasmic reticulum (ER) stress response and increased levels of oxidative stress are associated with the expression of mutant TDP-43 or FUS proteins in cells<sup>24</sup>. Thus, we investigated whether nlp-29::GFP expression was induced by either ER or oxidative stress. Chemical induction of the ER stress response by tunicamycin, or the in vivo production of oxidative stress by juglone did not activate nlp-29::GFP expression (Supplementary Fig. 3a,b). Finally, the antioxidant n-acetylcysteine did not extinguish fluorescence signals in TDP-43<sup>A315T</sup>; nlp-29::GFP animals, suggesting that oxidative stress does not play a role in inducing nlp-29::GFP expression (Supplementary Fig. 3c).

### **Induction of an innate immune response requires neurosecretion.**

In our *C. elegans* models, the expression of mutant TDP-43 or FUS proteins is limited to 26 GABAergic neurons<sup>5</sup>, yet the nlp-29::GFP reporter shows expression in the intestine and hypodermis (Supplementary Fig. 1). These observations suggest some sort of cellular communication event occurs between the motor neurons and distal tissues like the



intestine and hypodermis. There are numerous developmental and behavioural phenomena that rely on communication between the nervous system and intestinal tissue in *C. elegans*. For example, neuron-intestine communication via insulin-like peptides regulates the dauer diapause decision during development<sup>25</sup>, and intestinal signalling to GABAergic neurons regulates a highly coordinated defecation motor programme<sup>26</sup>. Furthermore, we previously reported a cell-nonautonomous effect for mutant TDP-43 proteins in activating the ER unfolded protein response. *hsp-4* encodes a *C. elegans* Hsp70 protein orthologous to mammalian Grp78/BiP, and the transgenic *C. elegans* *hsp-4::GFP* reporter is activated in intestinal tissue by the expression of mutant TDP-43 in motor neurons<sup>6</sup>. The relentless disease progression seen in ALS may be due to extracellular mechanisms including the activity of unknown secreted molecules capable of spreading disease to adjacent tissues<sup>27</sup>.

Recent reports show that the cell non-autonomous activation of the ER stress<sup>28</sup> and heat-shock<sup>29</sup> responses in *C. elegans* requires proteins responsible for neurosecretion, namely small clear vesicles (SCV) releasing neurotransmitters, and dense core vesicles (DCV) that release neuropeptides<sup>30,31</sup>. Thus, we wondered whether the mutant TDP-43<sup>A315T</sup> mediated activation of *nlp-29::GFP* was dependent on neurosecretion. *unc-13* encodes a synaptic protein essential for the release of SCV, while *unc-31* encodes a calcium-dependent activator protein required for the release of DCV<sup>30,31</sup>. Using loss of function mutations for *unc-13* and *unc-31*, we created TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29::GFP*; *unc-13(e540)* and TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29::GFP*; *unc-31(e928)* strains and observed that these animals had significantly less fluorescence than TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29::GFP* controls (Fig. 2a–c). Of interest, UNC13A is the human orthologue of *C. elegans* *unc-13*, and UNC13A has recently been identified as a modifier disease progression in ALS patients<sup>32–34</sup>. Thus, we hypothesized that signalling from the motor neurons *via* *unc-13* and *unc-31* may affect the toxicity of mutant ALS proteins. As *unc-13* and *unc-31* mutants show strong defects in motility, we were unable to test whether they affected the age-dependent paralysis phenotype displayed by mutant TDP-43<sup>A315T</sup> animals. Instead we examined whether blocking neurosecretion by *unc-13* or *unc-31* would have an effect on neurodegeneration. Animals expressing mutant TDP-43 proteins show age dependent degeneration of motor neurons<sup>5</sup>. Examination of the TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-13(e540)* and TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-31(e928)* strains revealed significantly decreased motor neuron degeneration compared with TDP-43<sup>A315T</sup> alone (Fig. 2d–f). These

data suggest that neurosecretion is required for activation of the innate immune response, as well as neurodegeneration elicited by mutant ALS proteins. Furthermore, our data support the notion that UNC-13/UNC13A is a functional modifier of ALS disease progression.

### **TIR-1 is required for motor neuron degeneration.**

We next set out to determine whether the *tir-1* pathway actively contributes to neuronal dysfunction and neurodegeneration in our ALS models. We constructed strains with a loss of function mutation for *tir-1* along with transgenics expressing mutant TDP-43 or FUS proteins. As described above, transgenic worms expressing mutant TDP-43 or FUS proteins show age-dependent motility defects leading to progressive paralysis and the degeneration of motor neurons<sup>5</sup>. We observed that TDP-43<sup>A315T</sup>; *tir-1(qd4)* and FUS<sup>S57Δ</sup>; *tir-1(qd4)* animals had significantly lower rates of paralysis compared with TDP-43<sup>A315T</sup> or FUS<sup>S57Δ</sup> alone with no effects on transgene expression (Fig. 3a–d). We also observed suppression of motor neuron degeneration in TDP-43<sup>A315T</sup>; *tir-1(qd4)* and FUS<sup>S57Δ</sup>; *tir-1(qd4)* animals compared with control strains (Fig. 3e). In laboratory settings, bacteria are the primary food source for *C. elegans*<sup>35</sup>. As the *tir-1* pathway can initiate an immune response due to bacterial infection, we wished to determine the contribution of any bacterial influence on the suppression of TDP-43 motor neuron toxicity by examining the rate of paralysis of TDP-43<sup>A315T</sup>; *tir-1(qd4)* animals grown on heat-killed OP50 bacteria. We observed suppression of TDP-43<sup>A315T</sup> mediated paralysis similar to animals grown on live bacteria (Supplementary Fig. 4), suggesting that the presence of the bacterial food source does not influence *tir-1* or TDP-43 motor neuron phenotypes. In addition, we confirmed that *tir-1(qd4)* suppressed motility defects using an automated assay that measures the movement of *C. elegans* grown in liquid culture (Supplementary Fig. 5). These data suggest that *tir-1* contributes to neuronal dysfunction and degeneration caused by ALS associated mutant proteins.

### **TIR-1 activity in the nervous system promotes degeneration.**

Our data thus far indicate that mutant ALS proteins induce the expression of immune response genes via the *tir-1* pathway, and that blocking *tir-1* suppresses motor neuron

degeneration caused by mutant ALS proteins. Next we asked whether *tir-1* activity in the nervous system, distal tissues, or both was required for the paralysis phenotype caused by mutant TDP-43 proteins. To answer these questions we turned to an RNA-interference (RNAi) approach allowing for tissue-specific inhibition of *tir-1* activity. We created transgenic lines expressing mutant TDP-43 in conjunction with *C. elegans* strains that were sensitive to RNAi only within neurons, body wall muscle cells or intestinal tissue<sup>8</sup>. We observed that *tir-1* (RNAi) suppressed paralysis in worms sensitized to RNAi in the nervous system, but failed to suppress paralysis in strains sensitized to RNAi in body wall muscle cells or intestinal tissue (Supplementary Fig. 6). These data suggest that activation of the *tir-1* signalling pathway within the nervous system is required for mutant TDP-43 toxicity. Our emerging model is that mutant ALS proteins in the nervous system initiate a neurosecretory event that triggers an immune response in distal tissues (intestine, hypodermis) as well as locally in motor neurons leading to neurodegeneration.

### **TIR-1 pathway kinases promote neurodegeneration.**

Essential to the TIR-1 mediated response is a signalling cascade involving the kinases NSY-1/MAP3K, SEK-1/MAPK and PMK-1/p38 MAPK. To determine whether this signalling cassette is essential for motor neuron dysfunction and degeneration, we crossed the TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics with loss of function mutations for *nsy-1*, *sek-1* or *pmk-1*. We observed significant reduction of TDP-43<sup>A315T</sup> induced paralysis and neurodegeneration in TDP-43<sup>A315T</sup>; *nsy-1(ok593)*, TDP-43<sup>A315T</sup>; *sek-1(km4)*, and TDP-43<sup>A315T</sup>; *pmk-1(km25)* compared with TDP-43<sup>A315T</sup> control strains (Fig. 4a,b).

As genetic loss-of-function mutations in genes encoding the kinases NSY-1, SEK-1 and PMK-1 all suppressed TDP-43 motor neuron toxicity, we hypothesized that these proteins would be excellent targets for inhibition of their activity by small molecules. Furthermore, mitogen-activated protein kinases have been extensively studied for pharmacological targeting of the innate immune response<sup>36</sup>, and some of these small molecules are clinically approved. We tested the p38 kinase inhibitor SB203580 and observed that it reduced paralysis and neurodegeneration in TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics (Fig. 4c,d).

Finally, we treated TDP-43<sup>A315T</sup>; nlp-29::GFP animals with SB203580 and observed decreased fluorescence compared with untreated controls (Fig. 4e), suggesting that chemically inhibiting PMK-1 leads to a concomitant reduction of the innate immune response triggered by mutant ALS proteins. Thus, our data demonstrate that inhibition of the kinase signalling cascade pathway downstream from TIR-1 reduces mutant TDP-43-dependent immune system activation and motor neuron degeneration.

### **Motor neuron degeneration requires ATF-7.**

Signalling via TIR-1, NSY-1, SEK-1 and PMK-1 requires the activity of the transcription factor ATF-7 to induce the expression of innate immune response genes in response to infection. Thus, we predicted that *atf-7* was required for the neurodegeneration caused by the expression of mutant ALS proteins in motor neurons. Using the loss of function mutation *atf-7(qd22)* we created TDP-43<sup>A315T</sup>; *atf-7(qd22)* animals and observed that these animals had significant reductions in the rate of paralysis and neurodegeneration compared with TDP-43<sup>A315T</sup> controls (Fig. 5). These data are consistent with the notion that *atf-7* functions as a downstream effector of the *tir-1* pathway, and that the chronic activation of ATF-7 promotes motor neuron degeneration caused by mutant ALS proteins.

Next we investigated whether or not the *tir-1* signalling pathway may generally affect the lifespan of worms, thus perhaps non-specifically delaying the onset of degenerative phenotypes in transgenics expressing mutant ALS proteins. However, lifespan analyses indicated that none of the mutations tested here including for *tir-1*, *nsy-1*, *sek-1*, *pmk-1* or *atf-7* extended the lifespan of mutant TDP-43 transgenics (Supplementary Fig. 7).

### **Mutant TDP-43 does not confer systemic stress resistance.**

Finally, a recent report demonstrated that DNA damage in *C. elegans* germ cells provokes a system wide innate immune response conferring systemic stress resistance<sup>37</sup>. Thus, we wondered whether mutant ALS proteins in the nervous system would likewise induce stress resistance. However, we previously reported that TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics have normal lifespan<sup>5</sup>, and here we observed that they displayed normal resistance to osmotic or thermal stress, but were sensitive to oxidative stress (Supplementary Fig. 8). Thus, the expression of mutant TDP-43 proteins in motor neurons does not produce a

general stress resistance phenotype, suggesting that neuronal proteotoxicity may elicit a stress response distinct from DNA damage in the germline.

### **DCAR-1 is not involved in motor neuron degeneration.**

TIR-1 is an adaptor protein believed to mediate signalling downstream from an otherwise unknown cell surface receptor proteins. Recently, the dihydrocaffeic acid receptor DCAR-1 was identified as a component of the TIR-1 signalling pathway in response to epidermal infection<sup>38</sup>. We wondered whether DCAR-1 also contributed to neurodegeneration from mutant ALS proteins, but found that *dcar-1* null mutations failed to suppress mutant TDP-43-mediated paralysis and motor neuron degeneration (Supplementary Fig. 9). Thus, additional upstream receptor proteins may be involved in transmitting signals in response to neuronal injury *via* TIR-1, but distinct from the DCAR-1 pathway.

## **DISCUSSION**

In higher systems, a variety of immune and non-immune cell types express toll-like receptors on their cell surface that recognize microbial pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and other receptors that recognize tissue damage signals, such as alarmins. Alarmins are often small molecules that are released into the extracellular environment by damaged or dying cells. *C. elegans* maintains extensive surveillance pathways to monitor fundamental cellular activities, that when disrupted are interpreted as attack by pathogens<sup>39</sup>. TDP-43 and FUS both contain low-complexity prion-like domains<sup>40</sup>, and TDP-43 has been reported to propagate between cells by an exosome mediated mechanism<sup>41</sup>. Thus, it is possible that mutant TDP-43 or FUS could engage the innate immune response, either directly or in response to alarmins released by damaged neurons. In this context, mutant ALS proteins in neurons may elicit an immune response as part of a host defense reaction against pathogens, or to aid tissue repair, or both. Future unbiased molecular and genetic analyses exploiting the power of the *C. elegans* system may help

identify the molecules necessary to induce the expression of nlp-29::GFP. Nonetheless, chronic engagement of the TIR-1 pathway in motor neurons ultimately leads to neurodegeneration (Fig. 6).

We investigated TIR-1 as a modifier of TDP-43 and FUS proteotoxicity due to its role in the *C. elegans* innate immune system. The *Drosophila* orthologue, dSarm, was identified from a forward genetic screen for mutations that promoted long-term survival of severed axons, and this protective activity was also observed in mice with a knockout allele for Sarm1<sup>42,43</sup>. These data suggest that TIR-1/Sarm1 may actively participate in a cell death programme targeting damaged axons, which may be relevant to the axon ‘dying back’ phenotype observed in neurodegenerative diseases including ALS<sup>44</sup>. Furthermore, *tir-1* has been linked to a non-apoptotic cell death pathway supporting our observations about ced-3/Caspase-3-independent mechanisms regulating TDP-43 toxicity in our *C. elegans* ALS models<sup>8</sup>.

We recently reported that motor neuron degeneration caused by mutant TDP-43 proceeds through dysregulated intracellular calcium signalling resulting in a necrosis-like degenerative phenotype<sup>8</sup>. Here, an accumulation of cytosolic calcium activates calpain proteases that in turn activate killer aspartyl proteases leading to cell destruction<sup>45</sup>. A recent study using mammalian models demonstrated that axonal injury phenotypes mediated by Sarm1 also require calpain proteases<sup>46</sup>. Thus, there may be a convergence of the TIR-1/Sarm1 pathway in regulating motor neuron degeneration *via* calpain proteases in ALS.

A cardinal feature of many late-onset neurodegenerative diseases is the accumulation of misfolded proteins suggesting that there may be common pathogenic mechanisms underlying many of these diseases. Our data suggest that the pathogenic mechanisms of TDP-43 and FUS are similar in their ability to provoke an innate immune response, and this is distinct from other forms of proteotoxicity, namely polyglutamine toxicity in this instance. At this point we do not know whether the RNA homeostasis functions of TDP-43 and FUS are implicated in activation of the *tir-1* pathway and the innate immune response, or whether this extends to all genes associated with ALS. The development of new ALS models will help answer this question.

Essential to neurodegeneration and activation of nlp-29::GFP by mutant ALS proteins are the genes *unc-13* and *unc-31*, which encode proteins with roles in exocytosis<sup>31</sup>. SCV generally contain classical neurotransmitters, while DCV mainly transport neuropeptides, thus it is not clear what, if any, cargos are shared between the two to induce the expression of nlp-29::GFP in our ALS models. However, there are similarities between SCV and DCV exocytosis; thus, there may be a common mechanism, or secreted molecule, signalling from diseased motor neurons.

The *C. elegans unc-13* gene encodes a presynaptic protein involved in the release of synaptic vesicles<sup>30</sup>. *unc-13* is evolutionarily conserved and the human orthologue UNC13A also has roles in the regulation of neurotransmitter release at neuromuscular junctions<sup>47</sup>. Directly relevant to ALS, several research groups have uncovered UNC13A as a potential susceptibility gene for ALS<sup>32-34,48</sup>. Thus, UNC13A may be a modifier of disease survival and could be a target for therapeutic development. We observed that deletion of *unc-13* suppressed motor neuron degeneration caused by mutant TDP-43 proteins. Thus, we provide the first functional validation of *unc-13/UNC13A* as a modifier of motor neuron degeneration caused by mutant ALS proteins.

TIR-1 is believed to act as adaptor protein downstream from the G protein-coupled receptor DCAR-1<sup>38</sup>, but we observed that genetic ablation of *dcar-1* did not rescue motility defects or neurodegeneration phenotypes caused by mutant TDP-43. These data suggest that other receptor proteins may be responsible for modulating neuronal degeneration in conjunction with TIR-1.

Recent work has demonstrated interactions between the SAM (sterile a motif) and TIR domains in Sarm1 are responsible for axonal degeneration phenotypes<sup>43</sup>, suggesting that inhibiting these domains may be a therapeutic strategy for limiting neurodegeneration. However, the kinases downstream from TIR/Sarm1, including the MAPK p38, have been the subject of numerous studies and many small molecule inhibitors of these protein kinases have been tested including in human clinical trials, most notably for rheumatoid arthritis<sup>49</sup>. Our *C. elegans* data demonstrate that genetic inhibition of the downstream MAPK pathway suppresses neurodegeneration; thus, these proteins may be excellent targets for inhibition by small molecules. Furthermore, there are a number of FDA approved compounds targeting the MAPK pathway that may have clinical relevance for ALS patients.

In summary, we have identified an evolutionarily conserved signalling pathway centred on TIR-1/Sarm1 that regulates motor neuron degeneration caused by mutant TDP-43 and FUS proteins. The components of this pathway regulate the innate immune response and neuronal survival thus providing new targets to aid the development of therapeutic approaches for ALS.

## METHODS

Standard methods of culturing and handling *C. elegans* were followed<sup>35</sup>. Worms were maintained on standard NGM plates streaked with OP50 *E. coli*. Strains used in this study were obtained from the *C. elegans* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis) unless indicated. Strains used in this study include: *atf-7(qd22)*, *dcar-1(tm2484)*, *frIs7[nlp-29p::GFP,col-12p::DsRed]*, *nsy-1(ok593)*, *oxIs12[unc-47p::GFP+lin-15]*, *pmk-1(km25)*, *sek-1(ag1)*, *tir-1(qd4)*, *unc-13(e450)* and *unc-31(e928)*. Mutant strains were outcrossed 4–6 times to N2 before use.

Transgenic lines expressing mutant TDP-43<sup>A315T</sup>, wild-type TDP-43 (TDP-43<sup>WT</sup>), mutant FUS<sup>S57A</sup> and wild-type FUS (FUS<sup>WT</sup>) were previously described<sup>5</sup> and created as follows: Human cDNAs for the TDP-43 and FUS alleles (kind gift from Dr Guy Rouleau, McGill University) were amplified by PCR and cloned into the Gateway vector pDONR221 following the manufacturer's protocol (Invitrogen). Multisite Gateway recombination was performed with the pDONR TDP-43 clones along with clones containing the *unc-47* promoter (kind gift from Dr Erik Jorgensen, University of Utah, and Dr Marc Hammarlund, Yale University), the *unc-54* 3' UTR plasmid pCM5.37 (Dr Geraldine Seydoux, Johns Hopkins, Addgene plasmid 17253) and the destination vector pCFJ150 (Dr Erik Jorgensen, University of Utah, Addgene plasmid 19329) to create *unc-47p::TDP-43* and *unc-47p::FUS* expression vectors. Transgenic lines were created by microinjection of *unc-119(ed3)* worms, multiple lines were generated and strains behaving similarly were kept for further analysis. Transgenes were integrated by UV irradiation and lines were outcrossed to wild-type N2



worms five times before use. Several strains showing comparable phenotypes and transgene expression levels were kept and the strains used in this study include xqls98[*unc-47p::FUS<sup>S57A</sup>*; *unc-119(+)*], xqls132[*unc-47p::TDP-43<sup>WT</sup>*; *unc-119(+)*], xqls133[*unc-47p::TDP-43<sup>A315T</sup>*; *unc-119(+)*] and xqls173[*unc-47p::FUS<sup>WT</sup>*; *unc-119(+)*].

### **Single-copy transgenic lines.**

Wild-type Ataxin-3-Q14, or mutant Ataxin-3-Q89 cDNAs (from Dr Guy Rouleau, McGill University) were cloned as described above using the Gateway cloning system (Invitrogen) to create *unc-47p::Ataxin-3-Q14* and *unc-47p::Ataxin-3-Q89* expression vectors. Transgenic lines were created by microinjection of *unc-119(ed3)* worms and screened for MoSCi transposon mediated single-copy insertion of the desired transgene. Several lines were isolated for each transgene of interest and those showing similar behavioural, transgene expression levels and molecular profiles were kept for further analysis. The strains used in this study include XQ350 *unc-119(ed3)*; ttTi5605mosII; xqls350(*unc-47p::ATXN3::CAG14*; *unc-119(+)*), and XQ351 *unc-119(ed3)*; ttTi5605mosII; xqls351(*unc-47p::ATXN3::CAG89*; *unc-119(+)*).

### **Western blotting.**

Fifteen plates of worms for each strain were collected with M9 buffer and protein extraction was performed with v/v RIPA, sonicated for 5min, centrifuged at 16,000g and the supernatants were quantified using BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Thirty micrograms per well of proteins were loaded in a 10% polyacrylamide gel for 90 min, transferred to nitrocellulose membranes (BioRad) and immunoblotted. Antibodies used: rabbit anti-TDP-43 (1:1,000, Proteintech), rabbit anti-FUS/TLS (1:500, Abcam) and mouse anti-Actin (1:5,000, MP Biomedical). Blots were visualized with peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL western blotting substrate (Thermo Scientific). Ladder used: Precision Plus Protein Kaleidoscope (BioRad). Densitometry was performed with Photoshop (Adobe). The uncropped scans of western blots are included in Supplementary Fig. 10.

### **RNAi experiments.**

RNA interference (RNAi)-treated strains were fed *E. coli* (HT115) containing an empty vector or *tir-1*(F13B10.1). RNAi clones from the ORFeome RNAi library (Open Biosystems). RNAi experiments were performed at 20°C. Worms were grown on Nematode Growth Media enriched with 1mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside. All RNAi paralysis tests were performed using a TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-47::GFP* in conjunction with the appropriate mutation and transgenes for tissue-specific silencing in neurons, intestine or muscle cells based on strains TU3401, VP303 or NR350, respectively. To minimize developmental effects, L4 worms were grown on plates with RNAi bacteria and assayed for paralysis as adults. Worms were transferred every 2 days.

### **Paralysis assays on solid media.**

Worms expressing TDP-43 or FUS 20–30 adult day 1 of adulthood animals were picked to NGM plates and scored daily for movement over 12 days. Animals were counted as paralysed if they failed to move upon prodding with a worm pick. Worms were scored as dead if they failed to move their head after being prodded on the nose and showed no pharyngeal pumping. All experiments were conducted at 20°C. Some experiments were conducted by dissolving SB203580 (Sigma) into the NGM plates.

### **Paralysis assay in liquid culture.**

Twenty, adult day 4 worms expressing TDP-43 were transferred to M9 buffer and the number of movements were scored using a WMicrotracker (Phylumtech). Experiments were done in triplicate.

### **Neurodegeneration assays.**

For scoring of neuronal processes for gaps or breakage, TDP-43 or FUS transgenic animals were selected at day 9 of adulthood for visualization of motor neurons processes in vivo. Animals were immobilized in M9 with 5mM levamisole and mounted on slides with 2% agarose pads. GFP was visualized at 505 nm using a Zeiss Axio Imager M2 microscope. The software used was Zen Pro 2012. Hundred worms were scored per condition.

The mean and s.e.m. were calculated for each trial and two-tailed t tests were used for statistical analysis.

### **RT-PCR assays.**

RNA samples were obtained from 15 confluent plates of worms, following Trizol (Invitrogen)/chloroform extraction and quantified with a Nano- Photometer (Implen). 0.01 mg or 0.1 mg of RNA are reverse transcribed with QuantiTect (Qiagen). Primers used include F08G5.6 forward, 5'-AGTTCCAGCT ATGGTATATGCTC-3' ; F08G5.6 reverse, 5'-CAATGGTTTCGTGGGCTCCA-3' ; F49F1.6 forward, 5'-GTGCCCCAAATTATAGCGTTCCA-3' ; F49F1.6 reverse, 5'-CTTCCACAAACTCCACAGGT-3' ; T24B8.5 forward, 5'-TGTGCTTGTAGCTTACACTGCTT-3' ; T24B8.5 reverse, 5'-CATAGTTTGGGCAGAGACCAG-3'.

### **Fluorescence microscopy.**

For visualization of nlp-29::GFP or unc-47::GFP animals, M9 buffer with 5mM levamisole was used for immobilization. Animals were mounted on slides with 2% agarose pads. Fluorescent expression for quantification was visualized with a Zeiss Axio Imager M2 microscope. Fluorescent expression was visualized with a DIC microscope Carl Zeiss AxioObserver A1. The software used was AxioVs40 4.8.2.0. Fifteen to forty worms 9 days aged were visualized. Image processing and quantification were done with Adobe Photoshop. To compare fluorescence, we calculated the changes in the ratio (size/intensity of fluorescence).

### **Statistics.**

Paralysis curves were generated and compared using the Log-rank (Mantel-Cox) test. Twenty to forty animals were tested per genotype and repeated at least three times. For fluorescence and neurodegeneration test, non-parametric t test was realized. Prism 5 (GraphPad Software) was used for all statistical analyses.

## REFERENCES

1. Turner, M. R. et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet. Neurol.* 12, 310–322 (2013).
2. Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M. & Shaw, P. J. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 616–630 (2011).
3. Guerreiro, R., Bras, J. & Hardy, J. SnapShot: genetics of ALS and FTD. *Cell* 160, 798–798.e1 (2015).
4. Therrien, M. & Parker, J. A. Worming forward: amyotrophic lateral sclerosis toxicity mechanisms and genetic interactions in *Caenorhabditis elegans*. *Front. Genet.* 5, 85 (2014).
5. Vaccaro, A. et al. Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in *C. elegans*. *PLoS ONE* 7, e31321 (2012).
6. Vaccaro, A. et al. TDP-1/TDP-43 regulates stress signaling and age-dependent proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 8, e1002806 (2012).
7. Therrien, M., Rouleau, G. A., Dion, P. A. & Parker, J. A. Deletion of C9ORF72 results in motor neuron degeneration and stress sensitivity in *C. elegans*. *PLoS ONE* 8, e83450 (2013).
8. Aggad, D., Vérièpe, J., Tauffenberger, A. & Parker, J. A. TDP-43 toxicity proceeds via calcium dysregulation and necrosis in aging *Caenorhabditis elegans* motor neurons. *J. Neurosci.* 34, 12093–12103 (2014).
9. Vaccaro, A. et al. Methylene blue protects against TDP-43 and FUS neuronal toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*. *PLoS ONE* 7, e42117 (2012).
10. Vaccaro, A. et al. Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity in vivo. *Neurobiol. Dis.* 55C, 64–75 (2013).
11. Tauffenberger, A., Julien, C. & Parker, J. A. Evaluation of longevity enhancing compounds against transactive response DNA-binding protein-43 neuronal toxicity. *Neurobiol. Aging* 34, 2175–2182 (2013).
12. Zhao, W., Beers, D. R. & Appel, S. H. Immune-mediated mechanisms in the pathoprosession of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8, 888–899 (2013).
13. Ermolaeva, M. A. & Schumacher, B. Insights from the worm: The *C. elegans* model for

innate immunity. *Semin. Immunol.* 26, 303–309 (2014).

14. Liberati, N. T. et al. Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 6593–6598 (2004).

15. Kim, D. H. et al. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science* 297, 623–626 (2002).

16. Couillault, C. et al. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat. Immunol.* 5, 488–494 (2004).

17. Pujol, N. et al. Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis. *Curr. Biol.* 18, 481–489 (2008).

18. Pujol, N. et al. Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.* 4, e1000105(2008).

19. Tong, A. et al. Negative regulation of *Caenorhabditis elegans* epidermal damage responses by death-associated protein kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 1457–1461 (2009).

20. Pukkila-Worley, R. et al. Stimulation of host immune defenses by a small molecule protects *C. elegans* from bacterial infection. *PLoS Genet.* 8, e1002733 (2012).

21. JebaMercy, G., Vigneshwari, L. & Balamurugan, K. A MAP Kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* is required for defense against infection by opportunistic *Proteus* species. *Microbes Infect.* 15, 550–568 (2013).

22. Matos, C. A., de Macedo-Ribeiro, S. & Carvalho, A. L. Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Prog. Neurobiol.* 95, 26–48 (2011).

23. Stochmanski, S. J. et al. Expanded ATXN3 frameshifting events are toxic in *Drosophila* and mammalian neuron models. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2211–2218 (2012).

24. Tadic, V., Prell, T., Lautenschlaeger, J. & Grosskreutz, J. The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell Neurosci.* 8, 147 (2014).

25. Hung, W. L., Wang, Y., Chitturi, J. & Zhen, M. A *Caenorhabditis elegans* developmental decision requires insulin signaling-mediated neuron-intestine communication. *Development* 141, 1767–1779 (2014).

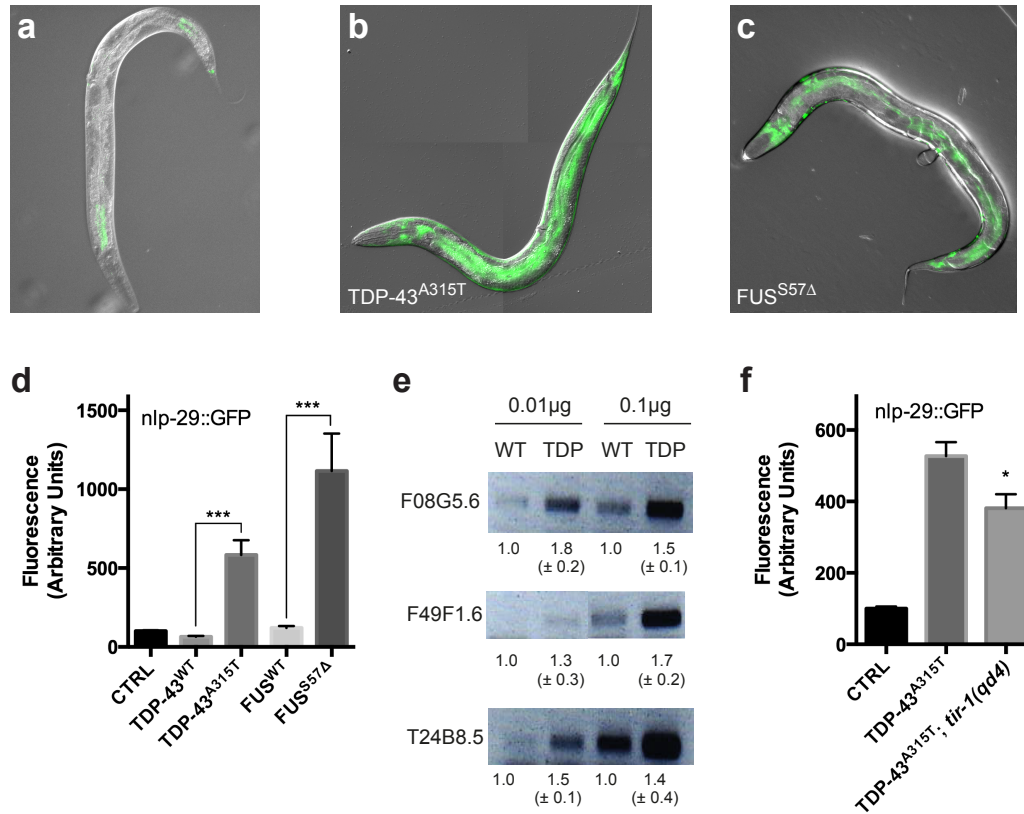
26. Mahoney, T. R. et al. Intestinal signaling to GABAergic neurons regulates a rhythmic behavior in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 105, 16350–16355 (2008).
27. Ling, S.-C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. Neuron 79, 416–438 (2013).
28. Taylor, R. C. & Dillin, A. XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity. Cell 153, 1435–1447 (2013).
29. van Oosten-Hawle, P., Porter, R. S. & Morimoto, R. I. Regulation of organismal proteostasis by transcellular chaperone signaling. Cell 153, 1366–1378 (2013).
30. Madison, J. M., Nurrish, S. & Kaplan, J. M. UNC-13 interaction with syntaxin is required for synaptic transmission. Curr. Biol. 15, 2236–2242 (2005).
31. Speese, S. et al. UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in *Caenorhabditis elegans*. J. Neurosci. 27, 6150–6162 (2007).
32. van Es, M. A. et al. Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Nat. Genet. 41, 1083–1087 (2009).
33. Diekstra, F. P. et al. UNC13A is a modifier of survival in amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol. Aging 33, 630.e3–8 (2012).
34. Diekstra, F. P. et al. C9orf72 and UNC13A are shared risk loci for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a genome-wide meta-analysis. Ann. Neurol. 76, 120–133 (2014).
35. Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans*. WormBook. 1–11 (2006doi:10.1895/wormbook.1.101.1).
36. Arthur, J. S. C. & Ley, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. Nat. Rev. Immunol. 13, 679–692 (2013).
37. Ermolaeva, M. A. et al. DNA damage in germ cells induces an innate immune response that triggers systemic stress resistance. Nature 501, 416–420 (2013).
38. Zugasti, O. et al. Activation of a G protein-coupled receptor by its endogenous ligand triggers the innate immune response of *Caenorhabditis elegans*. Nat. Immunol. 15, 833–838 (2014).
39. Melo, J. A. & Ruvkun, G. Inactivation of conserved *C. elegans* genes engages pathogen- and xenobiotic-associated defenses. Cell 149, 452–466 (2012).

40. Gitler, A. D. & Shorter, J. RNA-binding proteins with prion-like domains in ALS and FTL-D. *Prion* 5, 179–187 (2011).
41. Nonaka, T. et al. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 4, 124–134 (2013).
42. Osterloh, J. M. et al. dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. *Science* 337, 481–484 (2012).
43. Gerds, J., Summers, D. W., Sasaki, Y., DiAntonio, A. & Milbrandt, J. Sarm1-mediated axon degeneration requires both SAM and TIR interactions. *J. Neurosci.* 33, 13569–13580 (2013).
44. Dadon-Nachum, M., Melamed, E. & Offen, D. The ‘dying-back’ phenomenon of motor neurons in ALS. *J. Mol. Neurosci.* 43, 470–477 (2011).
45. Syntichaki, P., Xu, K., Driscoll, M. & Tavernarakis, N. Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* 419, 939–944 (2002).
46. Yang, J. et al. Pathological axonal death through a MAPK cascade that triggers a local energy deficit. *Cell* 160, 161–176 (2015).
47. Augustin, I., Rosenmund, C., Südhof, T. C. & Brose, N. Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400, 457–461 (1999).
48. Chiò, A. et al. UNC13A influences survival in Italian amyotrophic lateral sclerosis patients: a population-based study. *Neurobiol. Aging* 34, 357.e1–5 (2013).
49. Clark, A. R. & Dean, J. L. The p38 MAPK pathway in rheumatoid arthritis: a sideways look. *Open Rheumatol. J.* 6, 209–219 (2012).

## ACKNOWLEDGEMENTS

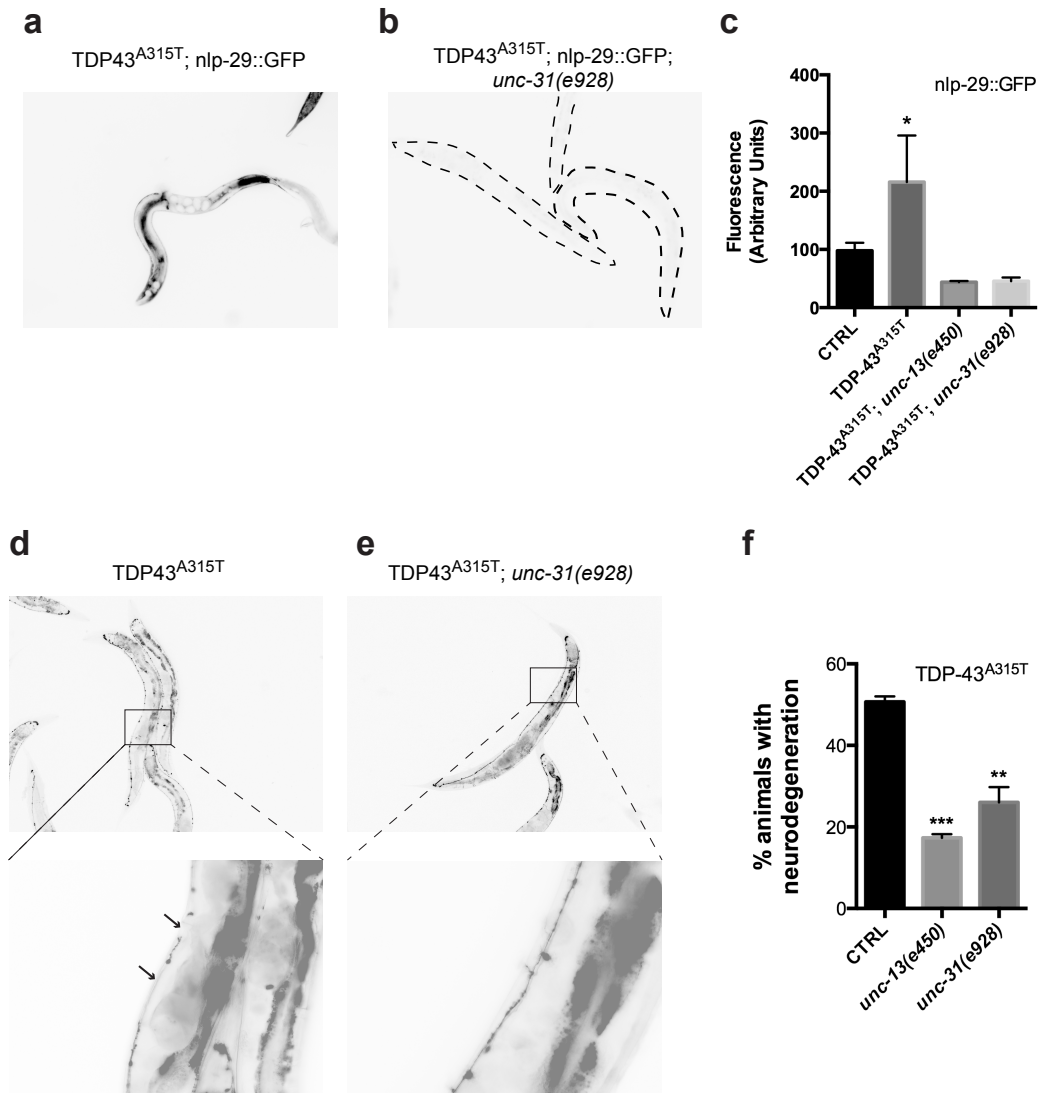
This work was supported by an ALS Canada-Brain Canada Discovery Grant, the Muscular Dystrophy Association (USA), and the Canadian Institutes for Health Research to J.A.P. We thank S. Peyrard for technical assistance, and A. Tauffenberger for the ataxin-3 strains.

## FIGURES



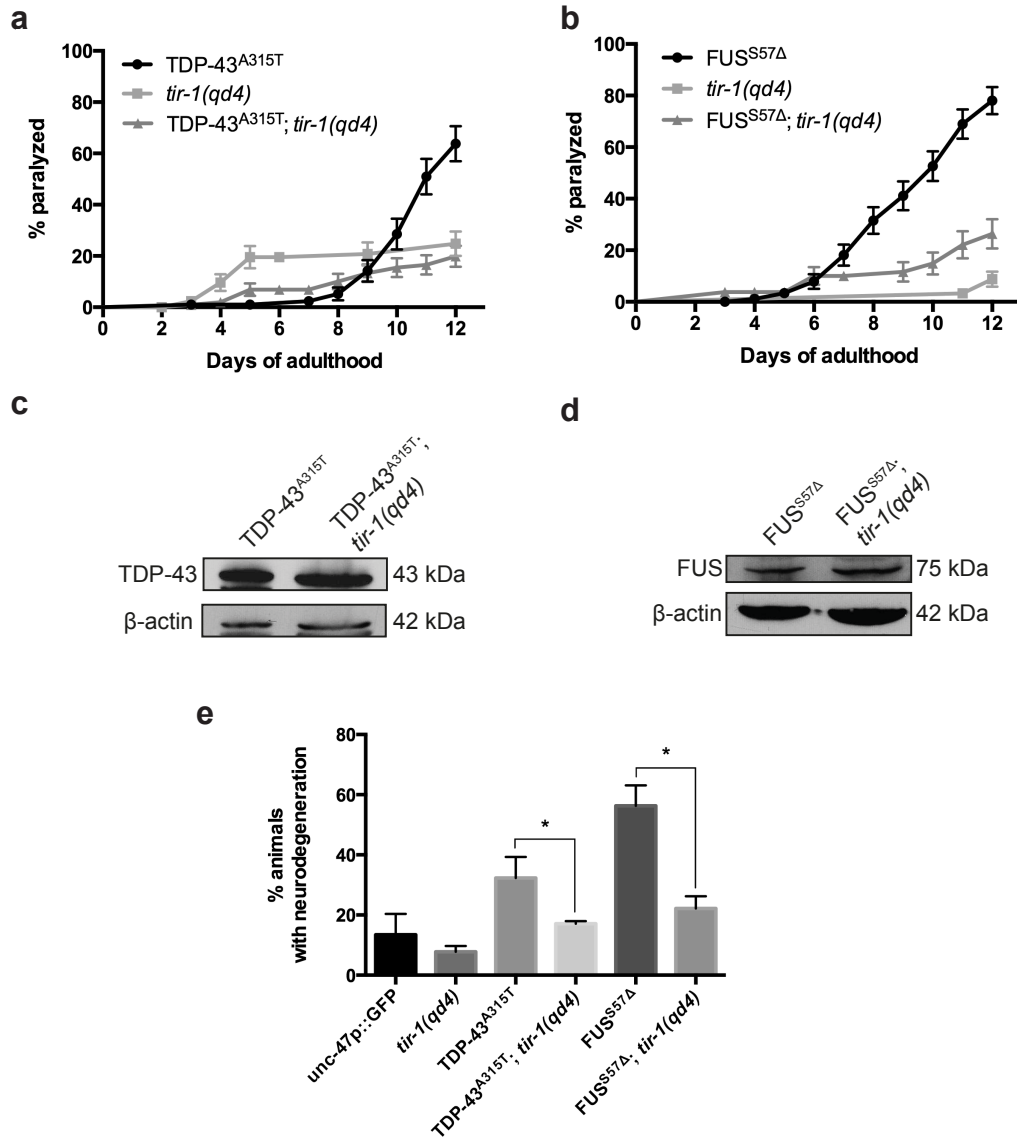
**Figure 1 Activation of immune-linked gene transcription in TDP-43 and FUS ALS models.** a-c, *nlp-29::GFP* reporter expression in intestinal and hypodermal tissue from (a) control, (b) TDP-43<sup>A315T</sup> and (c) FUS<sup>S57Δ</sup> animals. (d) Quantification of *nlp-29::GFP* fluorescence in control animals (CTRL, *n*=78) compared to animals also expressing TDP-43<sup>WT</sup> (*n*=36), TDP-43<sup>A315T</sup> (*n*=36), FUS<sup>WT</sup> (*n*=26), FUS<sup>S57Δ</sup> (*n*=72). Error bars represent SEM, \*\*\**P*<0.001, two-tailed t-test. (e) Semi-quantitative RT-PCR of three immune response genes in mutant TDP-43 transgenics (TDP) versus wild type controls. Shown are representative images, and the data is the mean ± SEM of three independent experiments normalized to control samples. (f) Quantification of *nlp-29::GFP* fluorescence TDP-43<sup>A315T</sup>; *tir-1(qd4)* animals (*n*=15) versus controls (CTRL, *n*=21; TDP-43<sup>A315T</sup>, *n*=18). \**P*<0.05, two-tailed t-test.



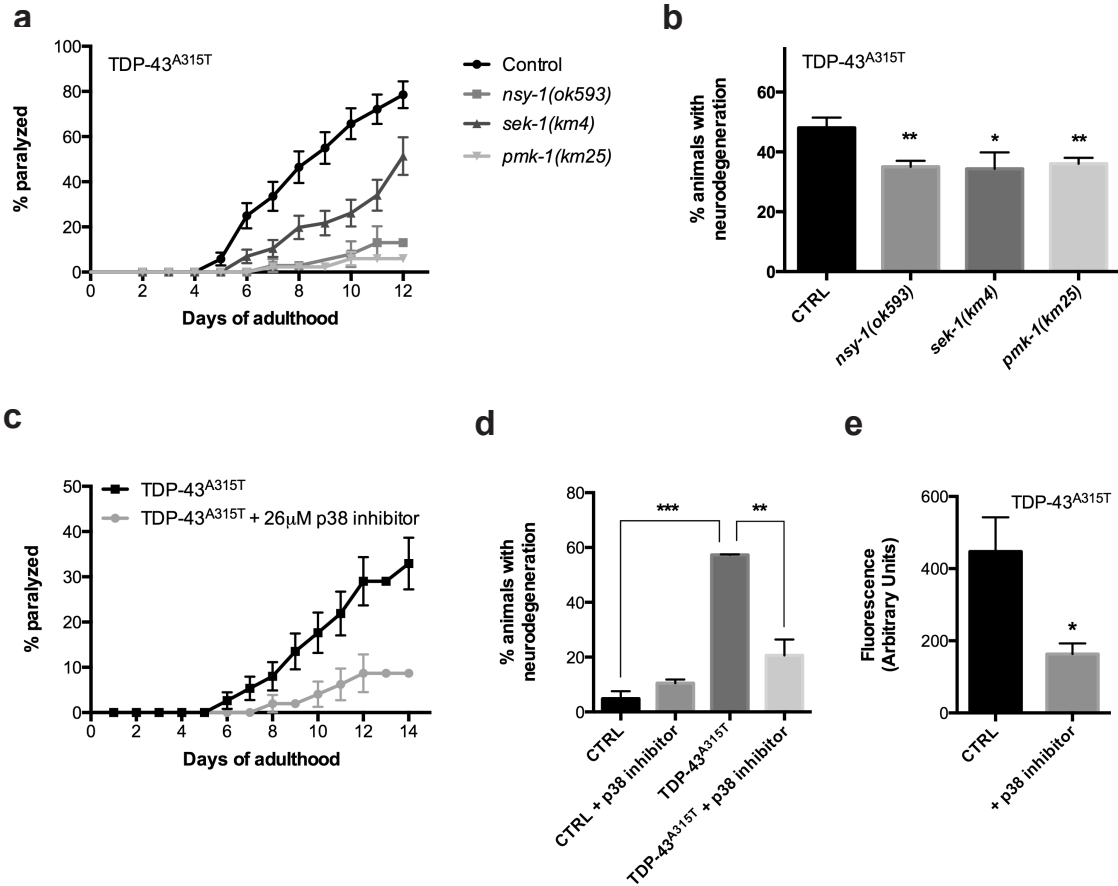


**Figure 2 Induction of the innate immune response and neurodegeneration require *unc-13* and *unc-31*.** Representative images of nlp-29::GFP expression in (a) TDP-43<sup>A315T</sup> and (b) TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-31(e928)* animals. (c) Quantification of nlp-29::GFP fluorescence in TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-13(e450)* (n=37), and TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-31(e928)* (n=38) animals plus controls (CTRL, n=45; TDP-43<sup>A315T</sup>, n=57). \*P<0.05, two-tailed t-test, error bars represent SEM. Representative images of (d) TDP-43<sup>A315T</sup> and (e) TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-31(e928)* animals expressing the *unc-47::GFP* reporter that fluoresces in GABAergic motor neurons. Degeneration, observed as gaps or breaks along neuronal processes are indicated (arrows). (f) Quantification of motor neuron degeneration in TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-13(e450)*, and TDP-

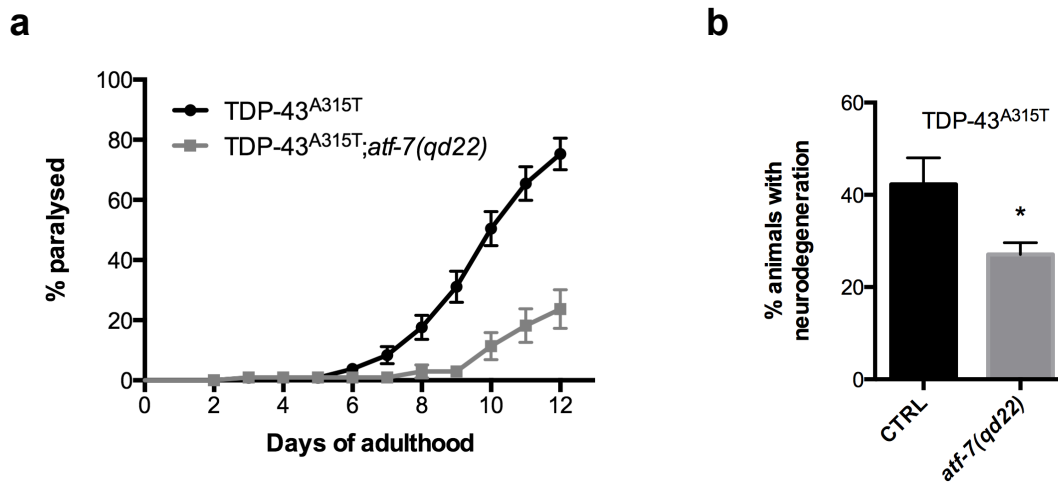
43<sup>A315T</sup>; *unc-31(e928)* animals versus TDP-43<sup>A315T</sup> controls \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, two-tailed t-test, error bars represent SEM. The fluorescent GFP images have been transformed to black & white and photo-reversed.



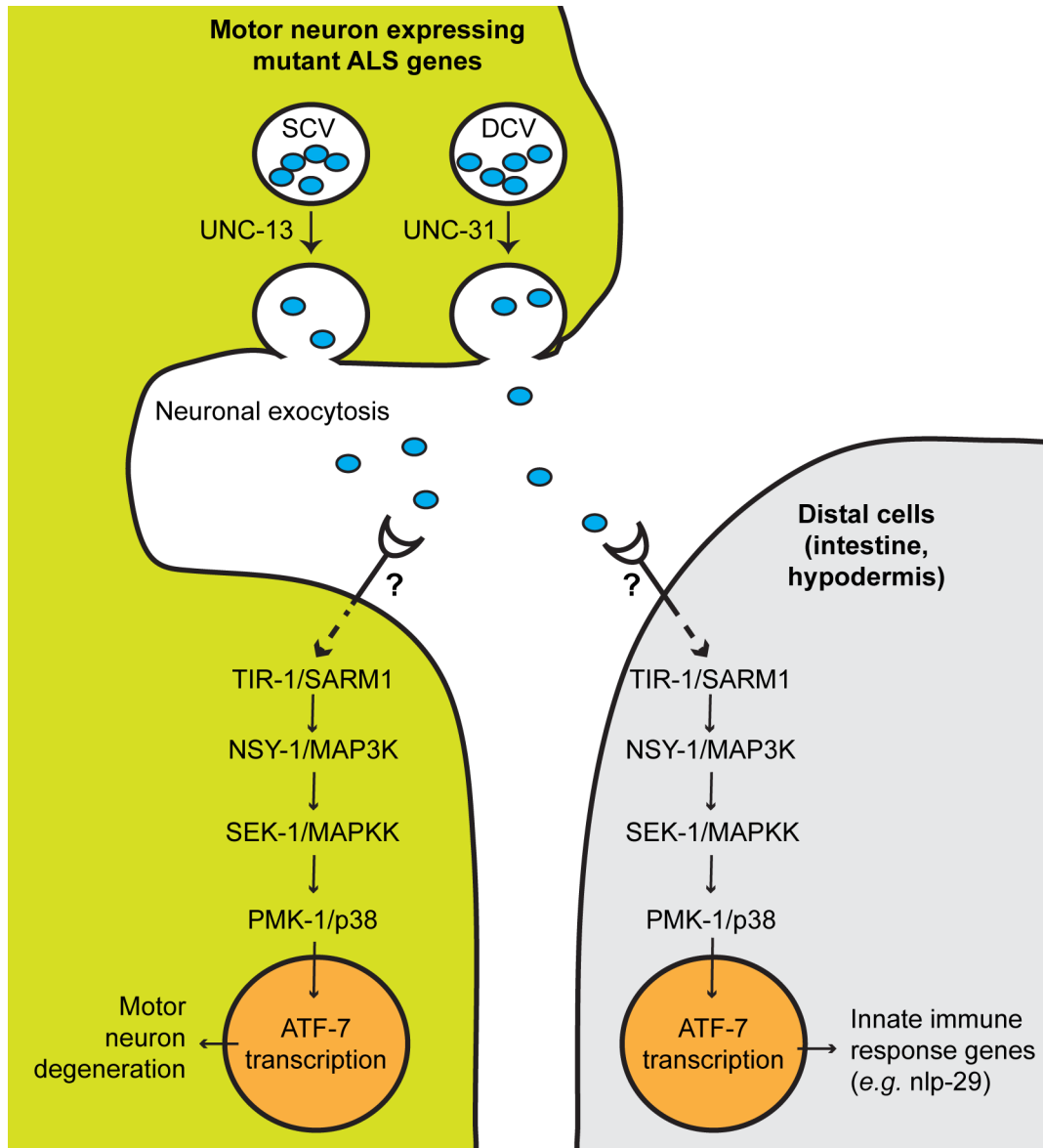
**Figure 3** *tir-1* promotes TDP-43<sup>A315T</sup> or FUS<sup>S57Δ</sup>-induced paralysis and neurodegeneration. The loss of function mutation *tir-1(qd4)* suppressed motility defects and progressive paralysis induced by (a) TDP-43<sup>A315T</sup> (TDP-43<sup>A315T</sup>, n=211; *tir-1(qd4)*, n=229; TDP-43<sup>A315T</sup>; *tir-1(qd4)*, n=187) or (b) FUS<sup>S57Δ</sup> (FUS<sup>S57Δ</sup>, n=159; *tir-1(qd4)*, n=151; FUS<sup>S57Δ</sup>; *tir-1(qd4)*, n=163) compared to controls, P<0.001, Log-rank (Mantel-Cox)-test, error bars represent SEM. Expression of (c) TDP-43 or (d) FUS proteins measured by Western blot. (e) Quantification of neurodegeneration in GABAergic motor neurons observed in TDP-43<sup>A315T</sup> or FUS<sup>S57Δ</sup> transgenics with and without the *tir-1(qd4)* mutation, \*P<0.05, two-tailed t-test, error bars represent SEM.



**Figure 4 Inhibition of the TIR-1 pathway kinase signalling pathway suppresses motor neuron degeneration.** Loss of function mutations  $nsy-1(ok593)$  (n=64),  $sek-1(km4)$  (n=112) or  $pmk-1(km25)$  (n=142) suppressed (a) TDP-43<sup>A315T</sup> mediated paralysis compared to TDP-43<sup>A315T</sup> alone (n=154), (P<0.001) and (b) motor neuron degeneration (\*P<0.05, \*\*P<0.01). The p38 kinase inhibitor SB203580 suppressed TDP-43<sup>A315T</sup> induced (c) paralysis (P<0.001, control, n=181; + p38 inhibitor, n=144), (d) neurodegeneration and (e) nlp-29::GFP expression versus untreated controls (CTRL, n=20; p38 inhibitor, n=15). Log-rank (Mantel-Cox)-test for paralysis assays, two-tailed t-test for all other experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. Error bars represent SEM.

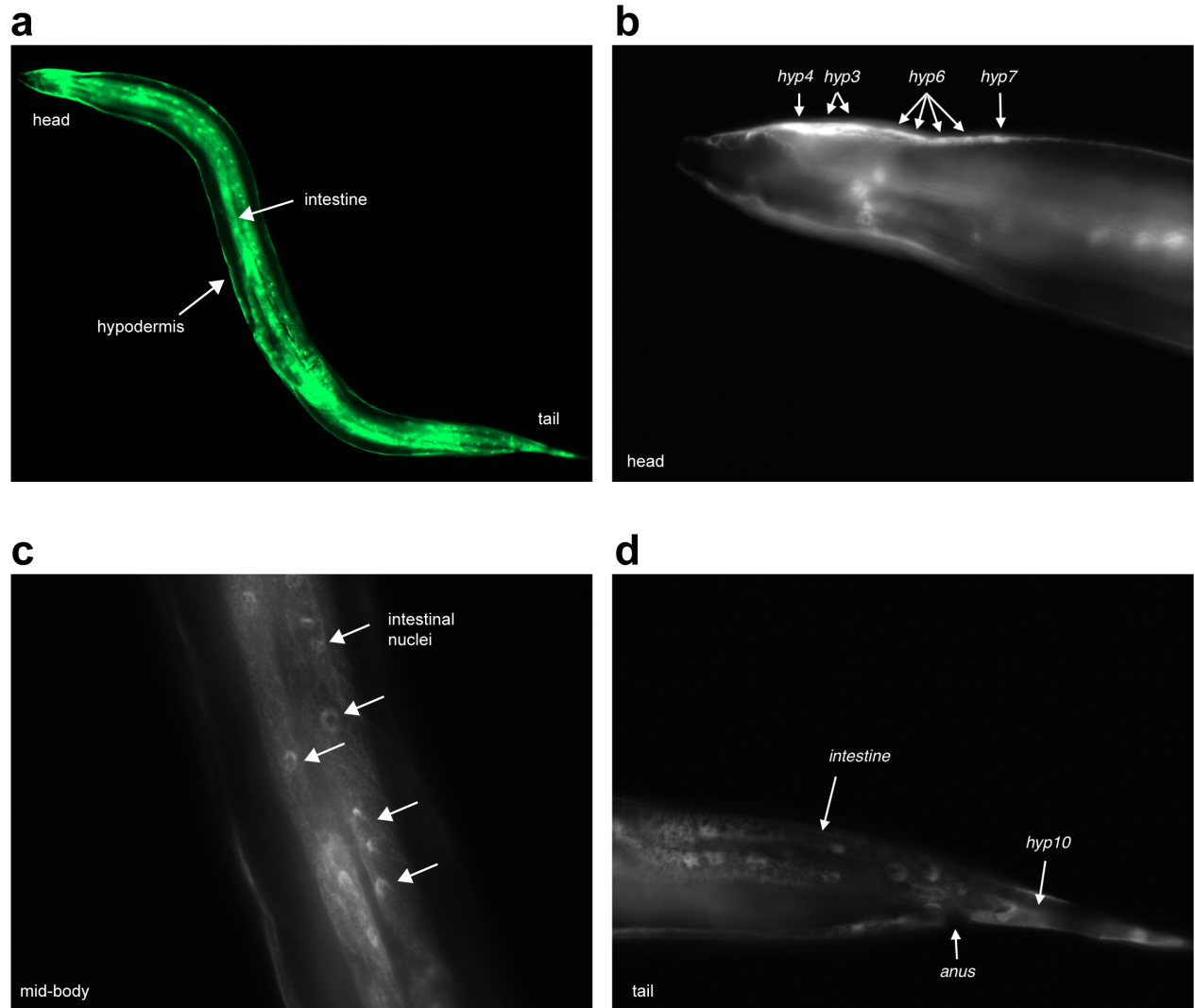


**Figure 5 *atf-7* is required for TDP-43 mediated motor neuron degeneration.** (a) The loss of function mutation *atf-7*(*qd22*) suppresses (a) paralysis ( $P < 0.001$ , CTRL,  $n = 179$ ; *atf-7*(*qd22*),  $n = 198$ ) and (b) motor neuron degeneration ( $*P < 0.01$ ) in transgenic TDP-43<sup>A315T</sup> animals compared to controls. The log-rank (Mantel-Cox)-test was used for paralysis assays and two-tailed t-tests were used for neurodegeneration experiments.



**Figure 6 Motor neuron degeneration via the TIR-1 signalling pathway.** Motor neurons expressing mutant ALS genes promote the release of a signalling molecule via neuronal exocytosis. UNC-13 is required for the release of small clear vesicles (SCV) and neurotransmitters, while UNC-31 is required for the release of dense core vesicles (DCV) containing mainly neuropeptides. The unknown secreted molecules then activate the TIR-1 signalling pathway resulting in the increased transcription of immune response genes, like *nlp-29* in distal intestinal and hypodermal cells. At the same time the secreted molecules activate the TIR-1 pathway in motor neurons leading to neurodegeneration.

## FIGURES SUPPLEMENTAIRES

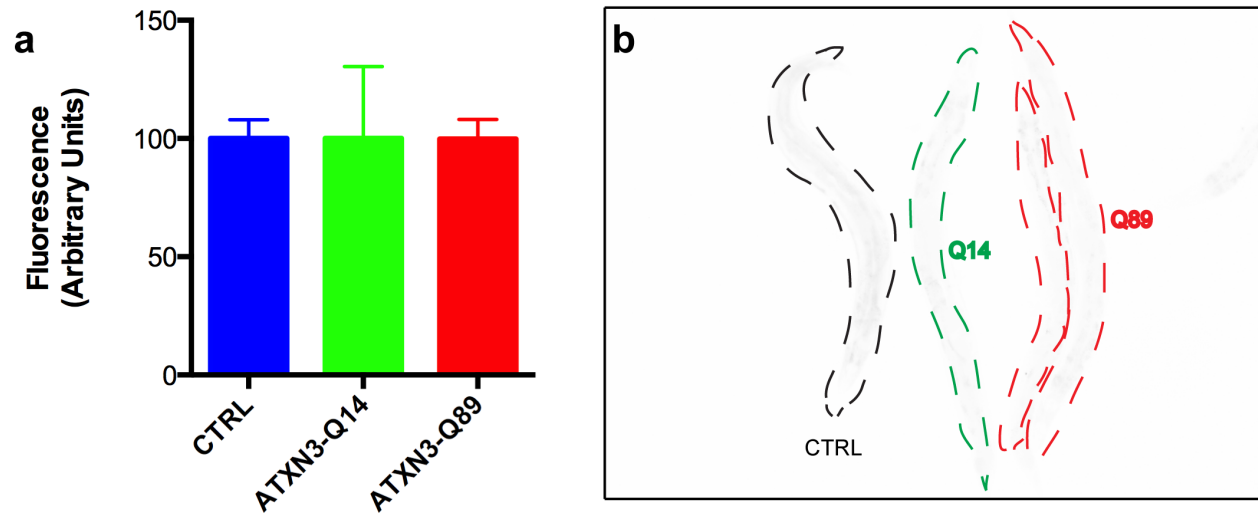


### Supplementary Figure 1 Expression of *nlp-29* in intestinal and hypodermal cells.

**a**, Low resolution image of a *nlp-29*::GFP transgenic showing fluorescent signals in intestinal and hypodermal cells (arrows). **b**, Zoomed image from (a) of the head region showing the expression of *nlp-29* in several hypodermal (hyp) cells (arrows). **c**, Zoomed image of the midbody of the worm from (a) showing the expression of *nlp-29*::GFP in the intestine. **d**, Zoomed image of the tail region of the worm from (a) showing *nlp-29*::GFP

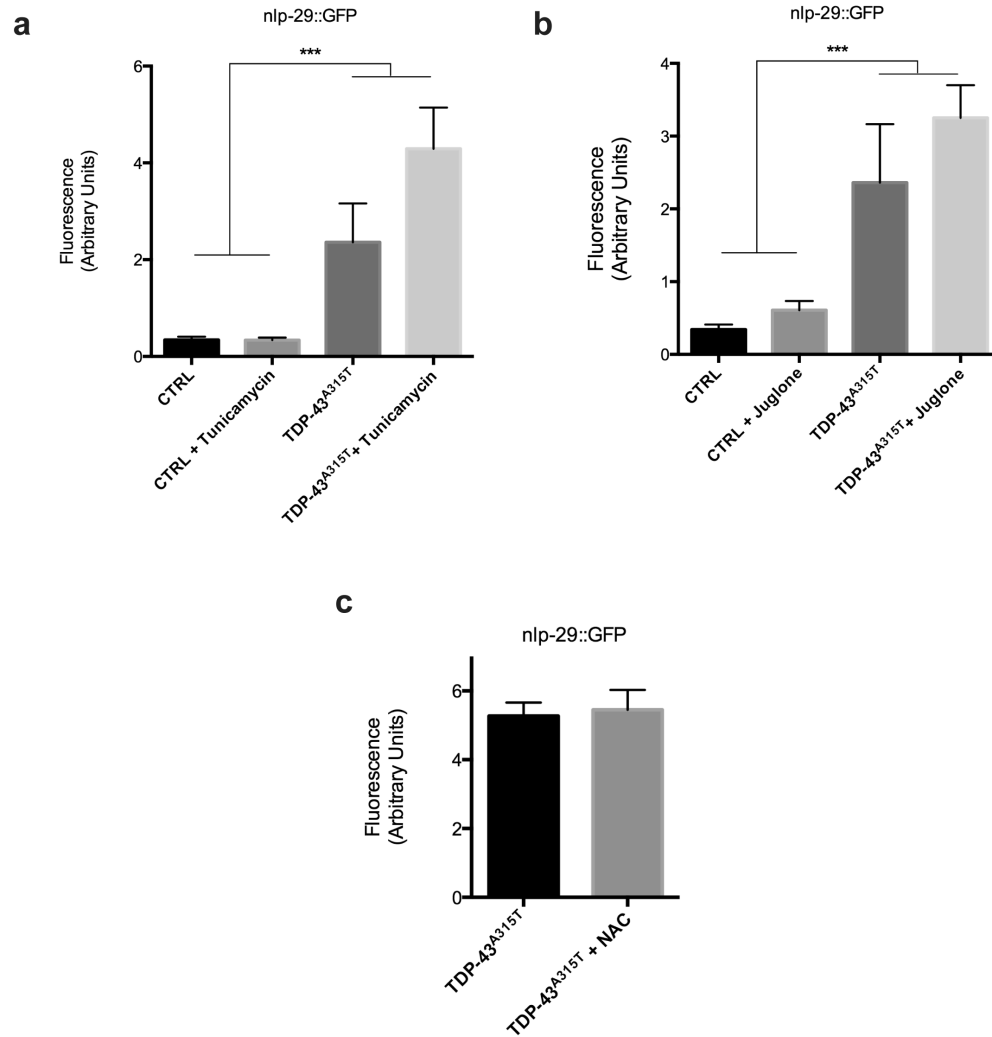
expression in intestinal and hypodermal cells. Images **b-c**, have been converted to grayscale to aid visualization.





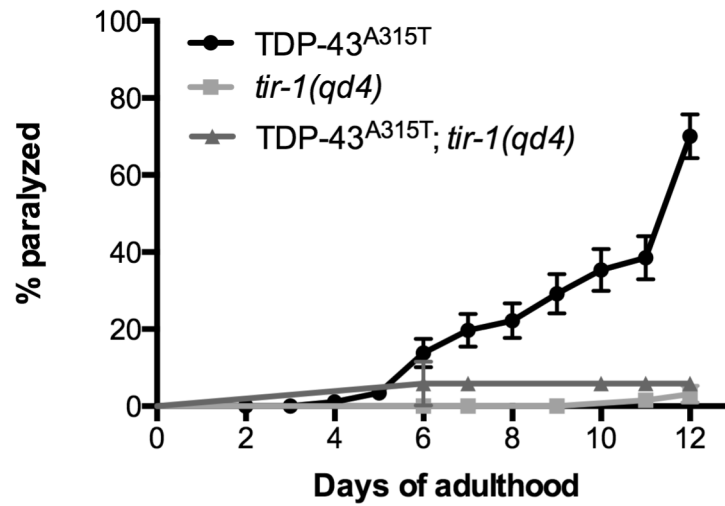
**Supplementary Figure 2 nlp-29::GFP expression is not induced by ataxin-3.**

**a**, nlp-29::GFP expression in transgenic worms expressing wild type (Q14) or mutant (Q89) ataxin-3. Two-tailed *t*-test was used. Error bars represent SEM. **b**, Representative images of control, Q14 or Q89 worms expressing with the nlp-29::GFP reporter. Images were converted to black & white, and photo-reversed to aid visualization. Worms are outlined to aid visualization.



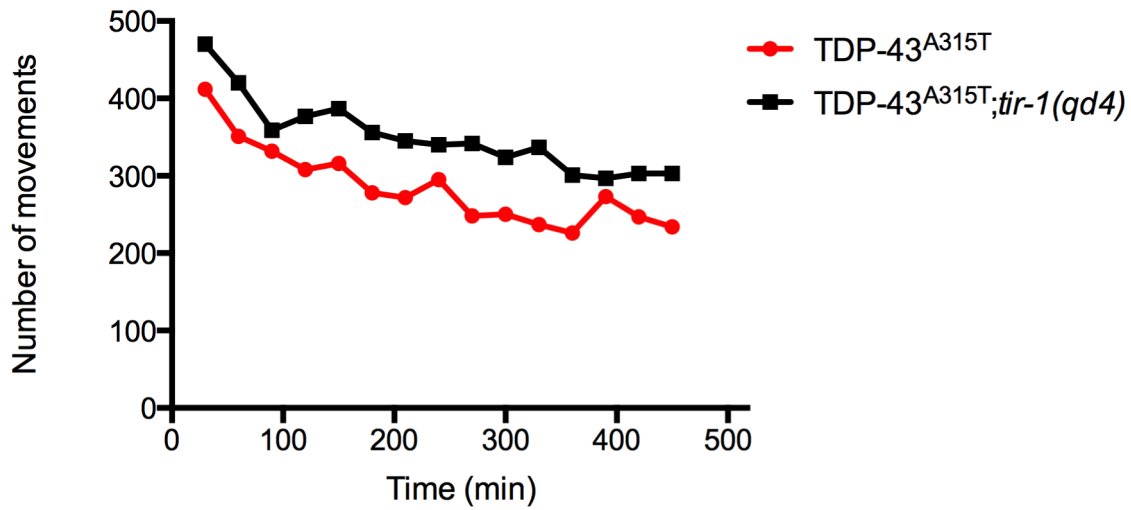
### Supplementary Figure 3 Oxidative and ER stresses do not activate the TIR-1 immune pathway.

nlp-29::GFP expression was not induced by the **a**, ER-stressor tunicamycin (CTRL, n=10; + tunicamycin, n=15; TDP-43<sup>A315T</sup>, n=10; TDP-43<sup>A315T</sup>+tunicamycin, n=15) or **b**, the oxidative-stress generating compound juglone (CTRL, n=10; + juglone, n=12; TDP-43<sup>A315T</sup>, n=10; TDP-43<sup>A315T</sup>+juglone, n=12). Mutant TDP-43<sup>A315T</sup> induced the expression of nlp-29::GFP, \*\*\* P<0.001, two-tailed *t*-test. **c**, The expression of nlp-29::GFP in TDP-43<sup>A315T</sup> animals (n=40) when treated with the antioxidant compound N-acetylcysteine (NAC) (n=27). Error bars represent SEM.



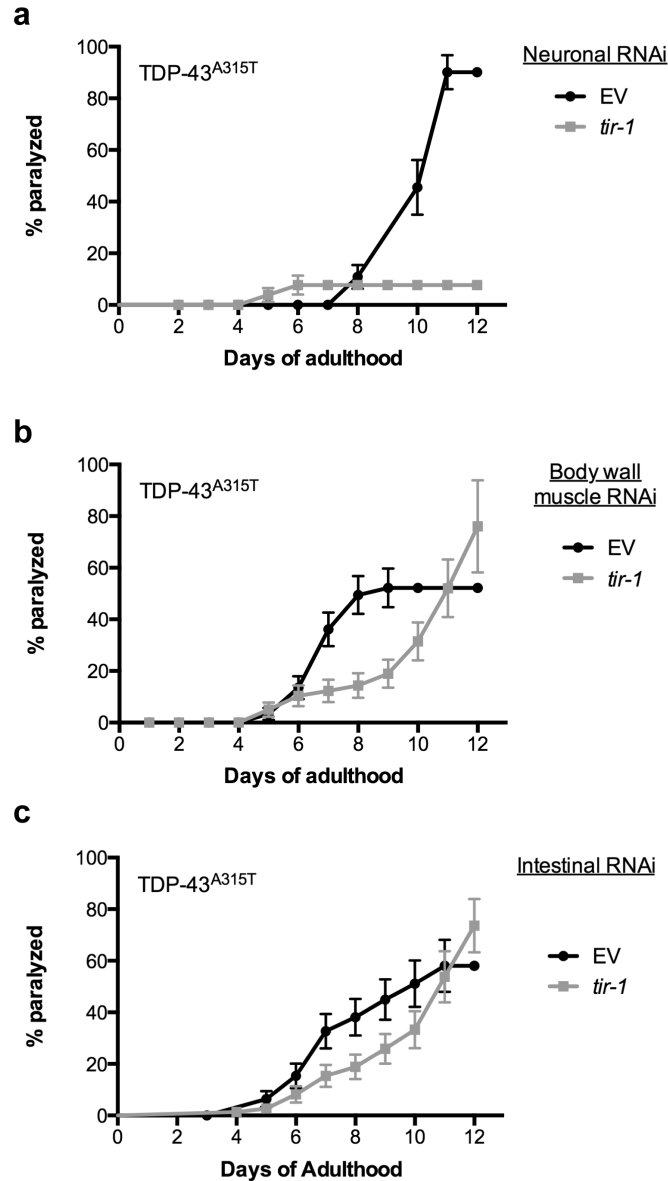
**Supplementary Figure 4 Suppression of TDP-43 paralysis by *tir-1* on dead bacteria.**

Percent of paralyzed TDP-43<sup>A315T</sup>, *tir-1(qd4)* (n=17), TDP-43<sup>A315T</sup> (n=91), or *tir-1(qd4)* (n=96) worms on heat killed *E. coli* OP50 bacteria. P<0.001 for TDP-43<sup>A315T</sup> vs. TDP-43<sup>A315T</sup>; *tir-1(qd4)*, (log-rank (Mantel-Cox)-test).



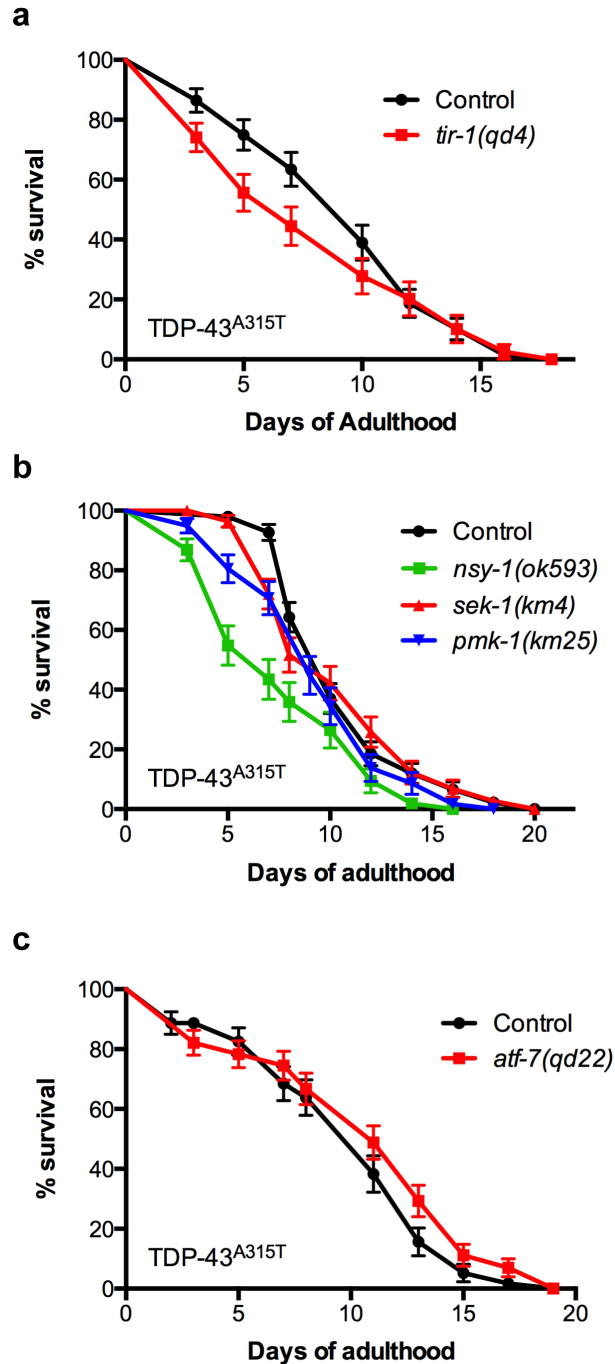
**Supplementary Figure 5 *tir-1(qd4)* suppresses swimming defects in TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics.**

As detected with an automated motility tracking system, TDP-43<sup>A315T</sup>; *tir-1(qd4)* animals showed improved swimming behaviour when placed in liquid culture compared to TDP-43<sup>A315T</sup> controls (P<0.01, unpaired *t*-test).



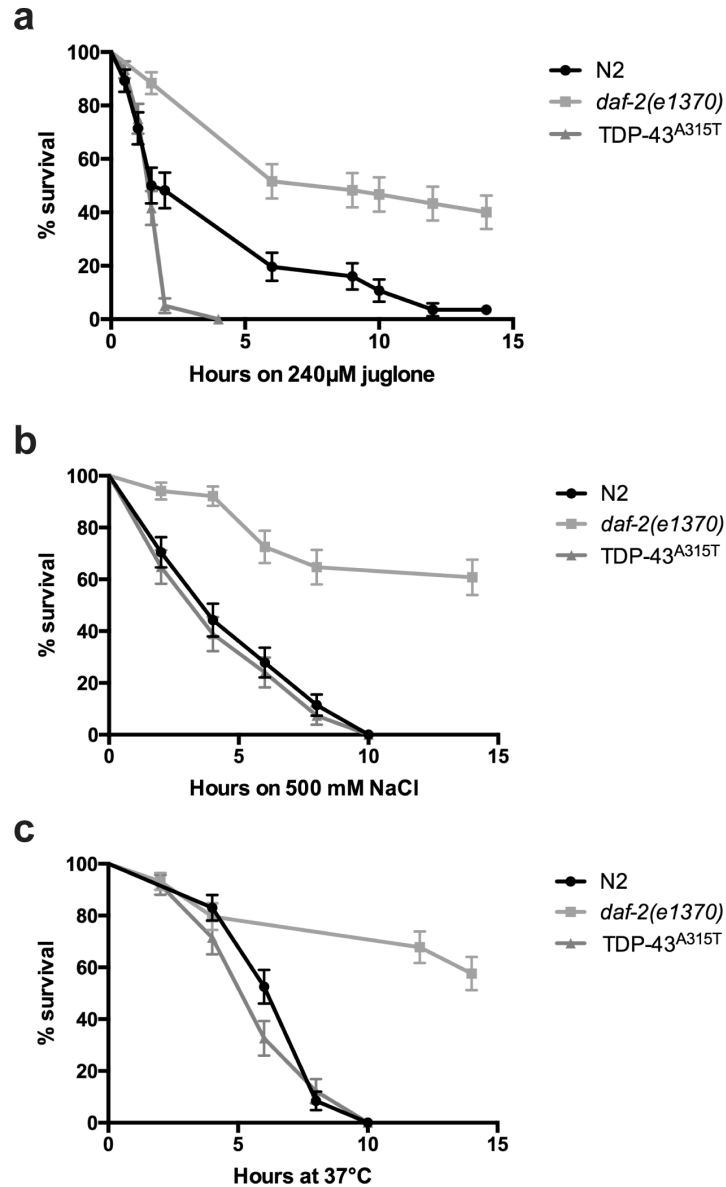
**Supplementary Figure 6 Neuronal specific *tir-1*(RNAi) suppresses TDP-43<sup>A315T</sup> induced paralysis.**

*tir-1*(RNAi) **a**, suppressed TDP-43<sup>A315T</sup> induced paralysis in a strain sensitized to RNAi only within the nervous system (EV, n=68; *tir-1*, n=69) but **b**, had no effect in strains sensitized to RNAi in body wall muscle cells (EV, n=85; *tir-1*, n=86), or **c**, sensitized to RNAi in intestinal tissue (EV, n=64; *tir-1*, n=73). P<0.001, log-rank (Mantel-Cox)-test for all experiments. Error bars represent SEM.



**Supplementary Figure 7 TIR-1 signalling pathway mutants do not increase lifespan.**

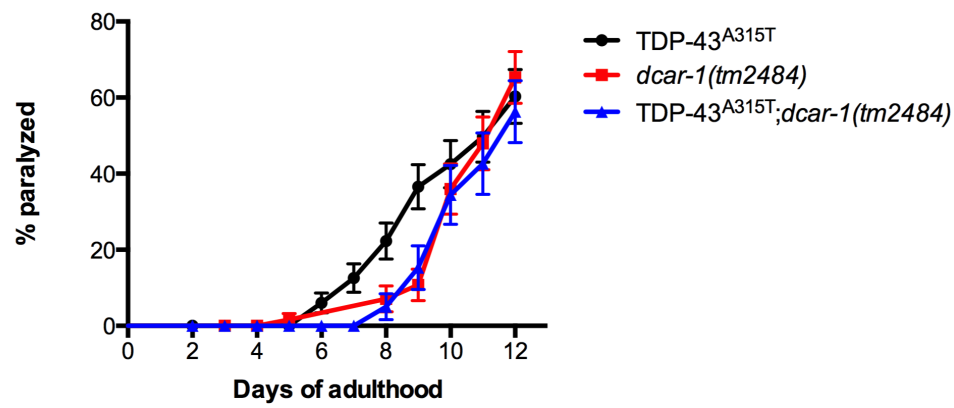
Mutations in **a**, *tir-1* (n=85), **b**, *nsy-1* (n=84), *sek-1* (n=93), *pmk-1* (n=79) or **c**, *atf-7* (n=84) do not extend the lifespan of TDP-43<sup>A315T</sup> transgenic worms compared to control strains (**a**, n=74; **b**, n=97; **c**, n=71).



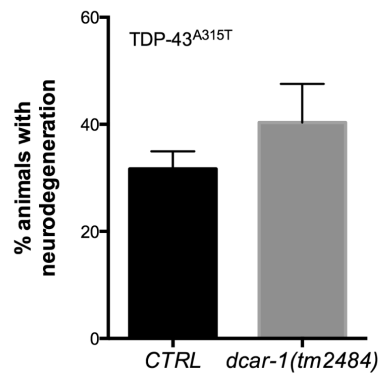
**Supplementary Figure 8 TDP-43<sup>A315T</sup> transgenic worms are sensitive to oxidative stress.**

**a**, TDP-43<sup>A315T</sup> transgenic worms displayed sensitivity to oxidative stress compared to N2 or *daf-2(e1370)* worms ( $P < 0.001$ , log-rank (Mantel-Cox)-test, N2,  $n = 60$ ; *daf-2(e1370)*,  $n = 107$ , TDP-43<sup>A315T</sup>,  $n = 119$ ). TDP-43<sup>A315T</sup> transgenic worms showed wild type sensitivity to **(b)** osmotic (N2,  $n = 61$ ; *daf-2(e1370)*,  $n = 51$ , TDP-43<sup>A315T</sup>,  $n = 54$ ) or **(c)** thermal stress (N2,  $n = 59$ ; *daf-2(e1370)*,  $n = 116$ , TDP-43<sup>A315T</sup>,  $n = 87$ ). Error bars represent SEM

**a**



**b**



**Supplementary Figure 9 *dcar-1* does not suppress mutant TDP-43 toxicity.**

The *dcar-1(tm2484)* mutation does not suppress TDP-43<sup>A315T</sup> associated **a**, paralysis (TDP-43<sup>A315T</sup>, n=162; *dcar-1(tm2484)*, n=134; TDP-43<sup>A315T</sup>; *dcar-1(tm2484)*, n=127) or **b**, motor neuron degeneration compared to control transgenics.



Figure 3c (top)

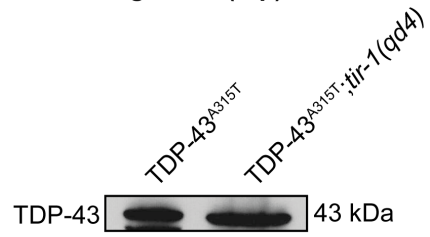


Figure 3d (top)

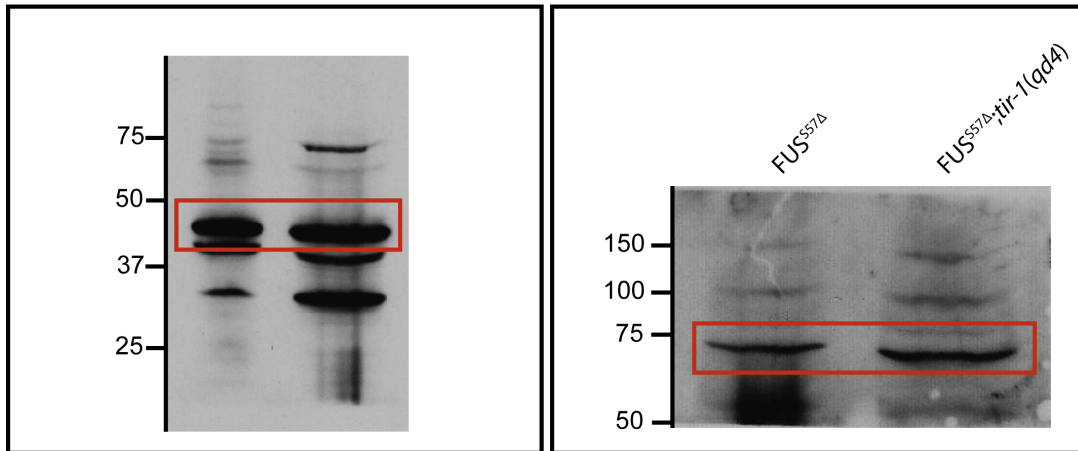
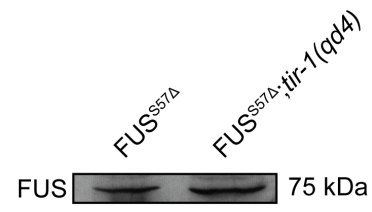


Figure 3c (bottom)

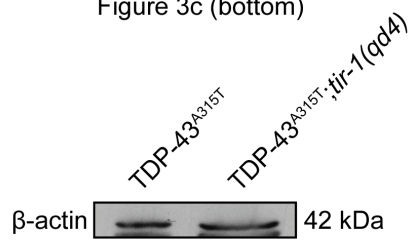
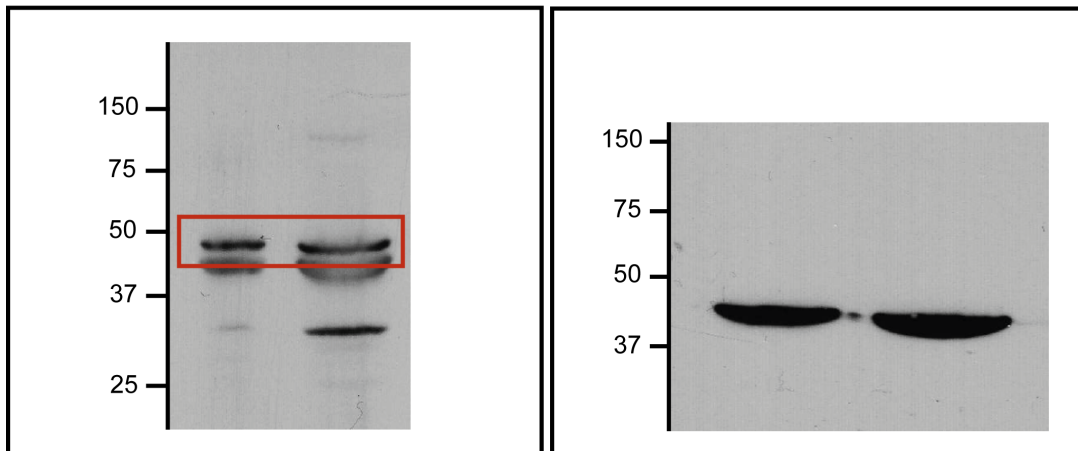
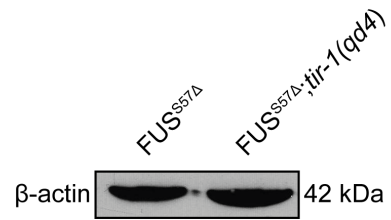


Figure 3d (bottom)



Supplementary Figure 10. Uncropped western blot images for Figures 3c-d.

## **II.2. MANUSCRIT 2 : TRANSCELLULAR SPREAD OF MOTOR NEURON DEGENERATION *VIA* TIR-1/Sarm1 AND THE MICRORNA let-7**

J. Vérièpe<sup>1, 2</sup>, C. Bretonneau<sup>1, 3</sup>, S. Tavares<sup>1</sup>, JA. Parker<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> CRCHUM, Montréal, Québec, Canada.

<sup>2</sup> Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>3</sup> Département de neurosciences, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Article en révision dans Journal of Neuroscience, Juin 2016

### Contributions

J.V. a fait les expériences, analysé et assemblé les données, ainsi qu'a contribué au montage du projet et à l'écriture du manuscrit.

C.B. a participé à faire les tests de longévité et de neurodégénérescence.

S.T. a contribué à faire les croisements de souches

J.A.P. a dirigé le projet et a participé à l'écriture du manuscrit.

## ABSTRACT

The progressive spread of cell death is a hallmark of many age-dependent neurodegenerative diseases, but the mechanisms remain unclear. We developed a *Caenorhabditis elegans* model of amyotrophic lateral sclerosis based on the expression of mutant TDP-43 only within GABAergic motor neurons. We observed the degeneration of not only GABAergic motor neurons, but neighbouring cholinergic motor neurons that do not express TDP-43. Here we report that the micro RNA let-7 is required for the progressive spread of motor neuron death in *C. elegans* models of TDP-43 toxicity *via* the TIR-1/Sarm1 pathway. Inactivation of *let-7* suppresses motor defects, neurodegeneration and activation of the innate immune response in this mutant TDP-43 model. let-7 may act as a transcellular signalling molecule to promote degeneration of neighbouring neurons and could be a therapeutic target for motor neuron diseases.

## **SIGNIFICANCE STATEMENT**

An active area of research in the field of late-onset neurodegeneration is the propagation of cell death across the nervous system. The progressive spread of neurodegeneration has been observed in diseases like amyotrophic lateral sclerosis (ALS) but the mechanisms remain unknown. Using *C. elegans* ALS models we discovered that the microRNA let-7 functions as a signalling molecule essential for progressive neurodegeneration. Central to this signalling pathway is the adaptor protein TIR-1/Sarm1, which has role as a conserved regulator of cell death. The signalling mechanisms required for TIR-1/Sarm1 remain unclear, but we provide the first evidence of a microRNA contribution and that this novel, conserved pathway may be useful for the development of new therapeutic strategies for ALS.

## INTRODUCTION

We use *Caenorhabditis elegans* to study mechanisms of motor neuron degeneration. A cardinal feature of many age-dependent human neurodegenerative diseases is the progressive spread of neuronal cell death (Aggad et al., 2014). Little is known about the genetic signalling pathways, or the secreted molecules responsible for transmitting signals from specific sender tissues under proteotoxic stress. We investigated transcellular spread of neurodegeneration using a *C. elegans* model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). This pathology is the most common motor neuron disease and there is no curative treatment. Many causative genes have been discovered, among which is *TARDBP*, encoding the DNA/RNA binding protein TDP-43 (Transactive response DNA binding protein -43) (Neumann et al., 2006). Our *C. elegans* model is based on the transgenic expression of full-length mutant human TDP-43 solely in GABAergic motor neurons, and these animals show age-dependent motility defects leading to paralysis and motor neuron degeneration (Vaccaro et al., 2012a).

Even though we make use of a simple genetic model of ALS, many questions remain. The spread of neurodegeneration is a major feature of ALS, so are neuronal populations besides the GABAergic motor neurons affected in our nematode model. We previously demonstrated that TDP-43 proteotoxicity acts through the Sarm1/TIR-1 pathway and that an innate immune response is activated in neurons and surrounding tissues including the intestine and hypodermis (Veriepe et al., 2015). However the danger signal delivered from GABAergic neurons is still unknown.

The past few years, especially in cancer field, has seen microRNAs emerge as powerful signalling molecules. They have been shown to be released for instance *via* exosomes and to be involved in ageing, senescence, inflammation and apoptosis (Gantier, 2010; Lehmann et al., 2012; Xu and Tahara, 2013). Here, we discovered that the expression of mutant TDP-43 in GABAergic neurons induces degeneration of neighbouring cholinergic neurons. This mechanism requires microRNAs and in particular let-7, already shown to be involved in an Alzheimer's disease model (Lehmann et al., 2012). Furthermore we observed that the ortholog of TLR in *C. elegans*, TOL-1, is implicated in TIR-1/Sarm1 and let-7

mediated neurodegeneration. MicroRNAs, and in particular *let-7*, may act as unconventional danger signal molecules in ALS and opens new therapeutic possibilities.

## METHODS

### Strains

Worms were cultured on standard NGM plates streaked with OP50 *E. coli*. Strains used in this study were obtained from the *C. elegans* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis) unless indicated. Strains used in this study are outcrossed with N2 at least 2 times and include: *dcr-1(mg375)*, *let-7(n2853)*, *let-7(mg279)*, *unc-119(ed3)*; *mals137[unc-119(+)+plet-7::GFP]*, *frIs7[nlp-29p::GFP,col-12p::DsRed]*, *unc-17p::GFP*; *unc-47p::mCherry*, *unc-47(e307)*, *unc-47(n2409)*, *lin-41(tn1487)*, *rme-8(b1023)*, *tol-1(nr2033)*, *unc-70(e524)* and *alfa-1(ok3062)*. Transgenic lines *xqls132[unc-47::TDP-43<sup>WT</sup>;unc-119(+)]*, *xqls133[unc-47::TDP-43<sup>A315T</sup>;unc-119(+)]*, *igIs1[mec-3::htt57Q128::CFP;mec-7::YFP;lin-15(+)]*, *igIs245[mec-3::htt57Q19::CFP;mec-7::YFP;lin-15(+)]* and single copy transgenic lines XQ350 *unc-119(ed3);ttTi5605mosII;xqls350(unc-47p::ATXN3::CAG14; unc-119(+))*, and XQ351 *unc-119(ed3);ttTi5605mosII;xqls351(unc-47p::ATXN3::CAG89;unc-119(+))* were previously described [371-373]. For the neuronal-specific silencing we crossed our mutant TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-47p::GFP* with TU3401 strain (*sid-1(pk3321)*; *uls69[pCFJ90(myo-2p::mCherry) + unc-119p::sid-1]*).

### RNAi experiments

*E. coli* (HT115) containing an empty vector or *dcr-1* (K12H4.8), *drsh-1* (F26E4.10), *alg-2* (T07D3.7), *tir-1* (F13B10.1) and *tol-1* (C07F11.1) clones were obtained from the ORFeome RNAi library (Open Biosystems) and were fed to worms. RNA interference (RNAi) experiments were performed at 20°C. Worms were grown on Nematode Growth Media (NGM) enriched with 2mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside. To minimize developmental effects, L4 worms were grown on plates with RNAi bacteria and assayed for neurodegeneration as adults. Worms were transferred every 2 days.

### **Quantitative and semi-quantitative real time-PCR**

Total RNA samples were purified with TriZol and the RNA concentration was quantified using a spectrophotometer (Implen NanoPhotometer UV/Vis spectrophotometer) and samples with a ratio of A260/A280 > 1.8 were kept. Semi-quantitative PCR was performed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystem, while quantitative PCR was used to detect microRNAs. Taqman Cel-lct-7\* (TaqMan® MicroRNA Assays, ThermoFisher Scientific, 241272) and LightCycler 480 Instrument II (Roche) were used according to manufacturer's recommendations. Quantification was normalized relatively to *sn2343* (small nucleolar RNA) controls, previously verified to be stable between samples. Samples were made in duplicates. Analysis was performed using 2- $\Delta\Delta C_t$  -method.

### **Paralysis test on solid media**

Assays commenced with 60-100 L4 worms on NGM plates divided over 3 plates. Worm motility was scored daily over 12 days of adulthood. Animals were counted as paralysed if they failed to move upon prodding with a worm pick. Worms were scored as dead if they failed to move their head after being prodded on the nose and showed no pharyngeal pumping. All experiments were conducted at 20°C.

### **Neurodegeneration assay**

Strains expressing GFP or mCherry transgenes were examined for gaps or breakage in *C. elegans*' GABAergic or cholinergic neurons. Transgenic worms were scored at day 9 of adulthood by mounting them *in vivo* on slides with 60% glycerol onto 2% agarose pads. GFP was visualized at 505 nm and mCherry at 610 nm using a Zeiss Axio Imager M2 microscope. The software used was AxioVs40 4.8.2.0. Approximately 100 worms were scored per condition. The experiments were conducted 3 times. The mean and s.e.m. were calculated for each trial and two-tailed t tests were used for statistical analysis.

### **Fluorescent reporter assays**

Animals were mounted on slides with 2% agarose pads with 60% glycerol for immobilization. Fluorescence was visualized with a Zeiss Axio Imager M2 microscope, and

for DIC with Zeiss AxioObserver A1. The software used was AxioVs40 4.8.2.0. 15-40 worms at days 7 or 9 of adulthood were visualized. Image processing and quantification were done with Adobe Photoshop.

### **Western Blotting**

Worms were collected from 15 NGM plates with M9 buffer. Protein extraction was performed using v/v of RIPA, dissociated with a syringe, sonication for 5 minutes, centrifugation at 16,000g and the supernatants were quantified using BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Thirty micrograms per well of protein were loaded in a 10% polyacrylamide gel for 90 minutes, transferred to nitrocellulose membranes (BioRad) and immunoblotted. Antibodies used were rabbit anti-TDP-43 (1:1,000, Proteintech) and mouse anti-Actin (1:5,000, MP Biomedical). Blots were visualized with peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL western blotting substrate (Thermo Scientific). Precision Plus Protein Kaleidoscope (BioRad) ladder was used. Densitometry was performed with Photoshop (Adobe).

### **Lifespan assay**

Lifespan test start with 60-100 L4 worms on NGM plates divided over 3 plates. Every 2 days, dead worms are counted until all animals are dead. Worms are scored as dead if they failed to move their head after being prodded on the nose and showed no pharyngeal pumping. Experiments were conducted at 20°C.

### **Binding Predictions**

TOL-1 and DCAR-1 sequences and conserved domains were provided by <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> and let-7 or miR-51 sequences from <http://mirbase.org>. Predictions of specific miRNAs binding to protein are based on Support Vector Machine (SVM) from RPISeq (<http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPISeq>), trained and based on two non-redundant datasets of RNA-protein interactions. miR-51 was used as negative control due to its restrictive expression condition. Prediction of RNA-binding location on TOL-1 was calculated from RNABindRPlus interface (<http://ailab1.ist.psu.edu/RNABindRPlus>), which combined SVM predictions and



homology-based method, of RNA-binding site are red marked.

### Statistical analysis

Paralysis and lifespan curves were generated and compared using the Log-rank (Mantel-Cox) test. All experiments were conducted at least 3 times. For fluorescence and neurodegeneration test, non-parametric t-tests were used. A Mann-Whitney statistic test was used for the qPCR. Prism 5 (GraphPad Software) was used for all statistical analyses.

## RESULTS

### TDP-43<sup>A315T</sup> proteotoxicity in GABAergic neurons spreads to cholinergic neurons

Worms move in a characteristic sinusoidal manner, bending their bodies by contracting muscles on one side of the body (*via* cholinergic signalling), while relaxing muscles *via* GABA innervation on the opposite side (Jorgensen, 2005). Thus, the two neuronal populations are in close proximity to one another and we wondered if the expression of mutant TDP-43 only in GABAergic neurons (Vaccaro et al., 2012a) influenced the integrity of the local cholinergic motor neurons (Figure 1A) (Altun and Hall, 2011). To answer this question we created transgenic worms expressing GFP in cholinergic motor neurons (*unc-17p::GFP*), and fluorescent red mCherry in GABAergic motor neurons (*unc-47p::mCherry*). We crossed this line with the TDP-43<sup>A315T</sup> transgenic strain and scored for axon breaks in aging worms. We observed that the expression of mutant TDP-43<sup>A315T</sup> in GABAergic motor neurons led to significant neurodegeneration at days 7 and 9 of adulthood compared to *unc-47p::mCherry* controls (Figure 1B-E). Interestingly, at day 9 of adulthood we observed degeneration of *unc-17p::GFP* cholinergic neurons in animals with GABAergic neurodegeneration compared to *unc-17p::GFP* transgenics without TDP-43<sup>A315T</sup> expressed in GABAergic motor neurons (Figure 1B-E). We wondered if generalized neuronal dysfunction and degeneration of GABAergic neurons could also have a negative effect on the survival of neighbouring neurons. *unc-47(e307)* and *unc-47(n2409)* are loss of function mutants for a vesicular GABA transporter (McIntire et al., 1997) that show early uncoordinated motor phenotypes and we observed the degeneration of GABAergic motor

neurons, but not cholinergic motor neurons, in these animals (Figure 1F). These data suggest that proteotoxically stressed GABAergic motor neurons transmit a pro-degeneration signal to local neurons, which shortly thereafter promotes neurodegeneration.

### **Non-cell autonomous proteotoxicity requires microRNA processing**

We recently reported that TDP-43-dependent motor neuron degeneration proceeds through dysregulated intracellular calcium signalling resulting in a necrosis-like degenerative phenotype (Aggad et al., 2014) and requires a Toll Interleukin 1 Receptor (TIR) domain adaptor protein (TIR-1) that is orthologous to human Sarm1 (Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1) (Veriepe et al., 2015). Previously, the Sarm1 protein was linked to neurodegeneration and neuronal death in a necroptosis-like manner and named ‘sarmoptosis’ (Gerdt et al., 2015; Mukherjee et al., 2015); however the mechanisms remain unclear. We hypothesized that dying motor neurons may be a source for self nucleic acids that signal and promote neurodegeneration of neighbouring cells. microRNAs are an intriguing group of RNA molecules that may signal and activate pathways leading to cell death (Su et al., 2015). Indeed, microRNAs can directly bind to Toll-like receptor (TLR) RNA-binding sites (Fabbri et al., 2012; Olivieri et al., 2013). In particular the microRNA let-7 is released from dying cells activating TLR7 expression in vertebrate neurons to trigger neurodegeneration and was shown to be increased in Alzheimer’s patients cerebrospinal fluid (Lehmann et al., 2012).

To explore the role of microRNAs in motor neuron degeneration, we used a *dcr-1/Dicer* mutant strain defective in microRNA biogenesis, and RNA interference (RNAi) to silence *alg-2/Argonaute-like* and *drsh-1/Drosha*, two genes specifically involved in miRNA processing. We crossed transgenic strains expressing mutant TDP-43<sup>A315T</sup> to the loss-of-function mutation *dcr-1(mg375)* and observed a dramatic decrease in age-dependent paralysis in TDP-43<sup>A315T</sup>; *dcr-1(mg375)* strains compared to TDP-43<sup>A315T</sup> controls (Figure 2A). Using a TDP-43<sup>A315T</sup> strain sensitive to RNAi only in the nervous system we observed a decrease of TDP-43<sup>A315T</sup>-induced paralysis and neurodegeneration in animals treated with *alg-2* or *drsh-1* RNAi (Figure 2B). Additionally, RNAi against *dcr-1*, *alg-2* or *drsh-1* reduced

motor neuron degeneration in TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics compared to control strains (Figure 2C). Finally we investigated the role of *dcr-1* in a non-cell autonomous toxicity mechanism by quantifying cholinergic neurodegeneration induced by TDP-43<sup>A315T</sup> from GABAergic motor neurons. We observed a significant decrease of cholinergic degeneration in *dcr-1* silenced strains (Figure 2D). These data suggest that there may be a specific microRNA responsible for TDP-43 toxicity in motor neurons, so we turned our attention to *let-7*.

### **let-7 is required for TDP-43<sup>A315T</sup> proteotoxicity**

The 22-nucleotide *let-7* sequence is highly conserved throughout evolution, and the 7-nucleotide GAGGUAG ‘seed sequence’ is present in all *let-7* family members across all species (Lee et al., 2015a). In adult animals we observed a 7.5 fold increase in the expression of *let-7* in TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics compared to wild type N2 controls (Figure 3A).

We next investigated whether there was a functional consequence of *let-7* expression on TDP-43<sup>A315T</sup>-dependent neuronal dysfunction and degeneration phenotypes (Vaccaro et al., 2012a). We crossed the TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics with the loss-of-function mutation *let-7(mg279)* and observed decreased rates of paralysis in TDP-43<sup>A315T</sup>; *let-7(mg279)* strains versus TDP-43<sup>A315T</sup> controls (Figure 3B). Suppression of the paralysis phenotype caused by mutant TDP-43<sup>A315T</sup> was accompanied by reduced motor neuron degeneration in TDP-43<sup>A315T</sup>; *let-7(mg279)* strains compared to TDP-43<sup>A315T</sup> transgenic controls (Figure 3C, D). The suppression of motor neuron toxicity was not due to decreased expression of the TDP-43<sup>A315T</sup> transgene (Figure 3E) or an extension of TDP-43<sup>A315T</sup> lifespan (Figure 3F). Together these data suggest that *let-7* is required for TDP-43<sup>A315T</sup>-induced motor deficits and neurodegeneration.

### **The transcellular spread of neurodegeneration requires let-7 via the TIR-1 pathway**

We previously showed that mutant TDP-43 activates the TIR-1 pathway (Veriepe et al., 2015), similar to what happens when *C. elegans* is subject to microbial infection (Couillault et al., 2004). Importantly, *let-7* was recently identified as an interactor of the TIR-1 pathway in regulating innate immunity in *C. elegans* (Ren and Ambros, 2015).

Downstream of TIR-1 are several kinases that activate the transcription factor ATF-7 leading to increased expression of genes including the antimicrobial peptide NLP-29. Importantly, in this system mutant TDP-43<sup>A315T</sup> is expressed exclusively in GABAergic motor neurons, while *nlp-29p::GFP* is expressed primarily in intestinal and hypodermal cells. Thus, TIR-1 is activated in a paracrine-like manner to initiate motor neuron degeneration in response to mutant TDP-43 in motor neurons, but TIR-1 is activated in distal tissues to promote expression of *nlp-29p::GFP* (Veriepe et al., 2015). We observed some specificity in the activation of *nlp-29p::GFP* since polyglutamine proteotoxicity models did not alter *nlp-29p::GFP* expression, while mutations leading to axon degeneration, including *unc-70/β-spectrin* (Hammarlund et al., 2007) and *alfa-1/C9ORF72* (Therrien et al., 2013) increased expression of *nlp-29p::GFP* (Figure 4A-D).

These data suggest there is transcellular signalling (van Oosten-Hawle and Morimoto, 2014) from degenerating motor neurons to distal tissues. However, little is known about the signals that activate TIR-1 to set this signalling pathway in motion in response to neuronal damage. We hypothesized there was a microRNA component required for activation of the reporter transgene *nlp-29p::GFP*. Transgenic TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP* strains show increased fluorescence compared to *nlp-29p::GFP* controls (Veriepe et al., 2015), but this fluorescence was extinguished in TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP*; *dcr-1(mg375)* strains (Figure 4E).

We next directly tested if *let-7* was involved and observed decreased fluorescence in TDP-43<sup>A315T</sup>; *let-7(n2853)*; *nlp-29p::GFP* strains compared to TDP-43; *nlp-29p::GFP* controls, but was comparable to TDP-43<sup>WT</sup>; *let-7(n2853)*; *nlp-29p::GFP* controls (Figure 4F). These data suggest *let-7* is required for activation of the TIR-1 signalling pathway in distal intestinal and hypodermal tissues in response to mutant TDP-43<sup>A315T</sup> in motor neurons. *let-7* has previously been linked to axon regeneration by regulating the expression of *lin-41*, which encodes a Ring finger-B box coiled coil protein (Zou et al., 2013). To investigate whether the *let-7/lin-41* regulatory circuit affected TDP-43 toxicity, we constructed a TDP-43<sup>A315T</sup>; *lin-41(tn1487)* strain and observed it had paralysis rates similar to TDP-43<sup>A315T</sup> transgenic controls (Figure 4G). These data suggest that *let-7* does not function with *lin-41* to regulate motor neuron survival in adult worms under proteotoxic stress, consistent with

findings that *lin-41* expression is restricted to development (Slack et al., 2000). Thus, *let-7* may act as a signalling molecule, independent of *lin-41*, to transmit status of proteotoxic stress leading to activation of an innate immune response and ultimately neurodegeneration.

To determine if this signal is proteotoxicity stress signal is endocytosed by intestinal cells or perhaps requires a receptor mediated mechanism, we used a mutation in *rme-8* in which intestinal endocytosis is blocked (Zhang et al., 2001). We crossed *rme-8* with TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP* to test if by inhibiting endocytosis, could we observe decreased TDP-43<sup>A315T</sup>-induced *nlp-29p::GFP* fluorescence or not. Interestingly, we observed no significant variation between the strains, suggesting that the signal may bind and activate a membrane receptor (Figure 4H).

### **TOL-1 receptor is required for TDP-43<sup>A315T</sup> non cell-autonomous proteotoxicity**

Mammalian Sarm1 is an adaptor protein for a number of Toll-like receptor proteins (TLR), while in *C. elegans* the receptor proteins associated with TIR-1 are less clear. The dihydrocaffeic acid receptor DCAR-1 was recently connected to the TIR-1 pathway in response to microbial infection (Zugasti et al., 2014), but *dcar-1* was not involved in motor neuron degeneration (Veriepe et al., 2015). TOL-1 is the sole *C. elegans* TLR and we wondered if it was involved in motor neuron degeneration. To investigate we crossed TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics with the deletion mutation *tol-1(nr2033)* and observed that TDP-43<sup>A315T</sup>; *tol-1(nr2033)* animals displayed significantly less paralysis and motor neuron degeneration compared to TDP-43<sup>A315T</sup> controls (Figure 5A,B). Furthermore, the increased fluorescence observed in TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP* transgenics was reduced in TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP*; *tol-1(nr2033)* animals (Figure 5C). Moreover, we silenced TIR-1 or TOL-1 in transgenic strain TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-47p::mCherry*; *unc-17p::GFP* and observed that cholinergic degeneration was reduced compared to controls and that this neurodegeneration was concomitant to GABAergic axon breakage (Figure 5D). These data suggest that TIR-1 and TOL-1 are involved in non-cell autonomous TDP-43-induced proteotoxicity originating in GABAergic neurons that spreads to neuronal neighbours.

To investigate the potential of molecular interactions between TOL-1 and let-7 we turned to biostatistical predictions. Using the RPISeq interface, we observed that the TOL-1 receptor is a potential binding partner to let-7 or let-7\* with a probability of 93% and 94% respectively, compared to 78% and 61% respectively to the DCAR-1 receptor (Figure 6A). We used miR-51 as negative control, expressed only in the pharynx during development and observed it had less than 70% of probability of bind TOL-1, and less than 51% probability of binding DCAR-1 (Figure 6A). As it was previously shown that let-7b directly binds to TLR7 (Lehmann et al., 2012), we used the RNABindRPlus interface to predict where a RNA molecule was more likely to bind along the TOL-1 protein sequence. We found that for most of the part, those sites are concentrated in the conserved TIR domain (Figure 6B).

Together, the results support the idea that TOL-1 is involved in mutant TDP-43-dependent motor neuron degeneration, and TOL-1 is also required for activation of the TIR-1/NLP-29 transcellular-signalling pathway, likely as a receptor protein bridging let-7 and TIR-1 (Figure 7).

## DISCUSSION

Transcellular signalling has previously been suggested to play a crucial role in ALS, and in particular toxic factors released via non-cell autonomous mechanisms are essential for motor neuron death (For review (Bendotti et al., 2005)). TDP-43 is a ribonucleoprotein involved in the cellular stress response including environmental stresses like heat shock, osmotic and oxidative stress (Anderson and Kedersha, 2009). We previously showed that the expression of TDP-43<sup>A315T</sup> in GABAergic neurons is able to induce the endoplasmic reticulum unfolded protein response (UPR<sup>ER</sup>) in distal tissues, as well as increase the level of oxidative stress in the entire animal (Vaccaro et al., 2012b). Our findings are in agreement with recent studies showing that impaired proteostasis within one cell type is registered and signalled to other tissues in an attempt to limit proteotoxicity and increase organism-wide stress resistance and survival (van Oosten-Hawle and Morimoto, 2014). *C. elegans* is emerging as a powerful model to investigate transcellular signalling in response

to proteotoxicity and notable examples include the heat shock response (van Oosten-Hawle et al., 2013) and the unfolded protein response (Taylor and Dillin, 2013) where signalling from the nervous system coordinates an organism-wide response promoting stress resistance, survival and often increased lifespan in worms.

In this study we describe a new mechanism where the expression of mutant TDP-43 in one subset of neurons can influence neurodegeneration in a second, adjacent group of neurons. Our recent work suggests that misfolded proteins in the nervous system communicate in a paracrine-like manner initiating an innate immune response via Sarm1/TIR-1 (Veriepe et al., 2015). Sarm1 was shown to be essential for axonal degeneration in *Drosophila* and in primary neurons from mouse (Osterloh et al., 2012; Gerdts et al., 2013) and its orthologue in *C. elegans*, TIR-1, as well (Blum et al., 2012; Veriepe et al., 2015) (For review : (Gerdts et al., 2016)). The neuronal death induced by *Sarm1* was independent of other forms of programmed cell death and named 'sarmoptosis' (Summers et al., 2014). Here we show that for animals expressing mutant TDP-43, the TIR-1 pathway is activated, but blocked in the absence of let-7. As a consequence, we observed decreased paralysis and motor neuron degeneration. Thus let-7 may be acting as signalling molecule responsible for the initiation of neurodegeneration in tissues distal from the initial proteotoxic insult.

A major clinical feature of ALS is a focal initiation of symptoms followed by progressive spread to other neuronal tissues (Ravits and La Spada, 2009). A part of this mechanism may involve a prion-like spread of mutant proteins as has been documented for TDP-43, FUS and SOD1 (Polymenidou and Cleveland, 2011). However there may exist a non-protein aspect of disease propagation. It was recently shown that the loss of microRNA mir-218 contributed to neuromuscular failure and neurodegeneration (Amin et al., 2015). Furthermore, let-7b has been linked to neurodegeneration in an Alzheimer's disease model by acting as a ligand for TLR7 (Lehmann et al., 2012). Since this danger signal is not endocytosed by adjacent cells, we propose that the microRNA let-7 contributes to motor degeneration via the TIR-1/Sarm1 pathway by binding a membrane receptor.

Toll-like receptors (TLRs) are present in many cell types including neurons (Kaul et al., 2012). Of interest are studies documenting increased TLR expression in in ALS models

and in *post-mortem* nervous tissue from ALS patients (Letiembre et al., 2009; Casula et al., 2011; Lee et al., 2015b). Moreover, TLR is abnormally activated in SOD1 mouse models of ALS (Nguyen, 2004; Zhao et al., 2010) (For review (Trotta et al., 2014)). Here, we observed that *C. elegans* orthologue of TLR, TOL-1, is crucial to develop TDP-43<sup>A315T</sup>-induced paralysis and neurodegeneration in a non-cell autonomous manner.

Since TLRs can bind short nucleic acid sequences (Lehmann et al., 2012), we wondered if TOL-1 had a similar activity for let-7. Due to technical limitations, we turned to algorithms to predict the possibility that let-7 directly binds TOL-1 in *C. elegans*. Our bioinformatics analysis predicted that TOL-1 has RNA-binding activity, which was especially favoured for let-7 miRNA.

In summary, we observe for the first time in vivo that the microRNA let-7 may act extracellularly to connect other cells including neurons and induce necroptosis and neuronal cell death, potentially *via* TOL-1. Thus, the let-7/TOL-1/TIR-1 pathway may be a series of therapeutic targets for motor neuron diseases.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by an ALS Canada-Brain Canada Discovery Grant, the Muscular Dystrophy Association (USA), and the Canadian Institutes for Health Research to J.A.P. We thank S. Peyrard for technical assistance, C. Maios and P. Ancuta for qPCR support, R. Roy for *dcr-1* RNAi and M. Simard for advice.

## REFERENCES

- Aggad D, Veriepe J, Tauffenberger A, Parker JA (2014) TDP-43 Toxicity Proceeds via Calcium Dysregulation and Necrosis in Aging *Caenorhabditis elegans* Motor Neurons. *Journal of Neuroscience* 34:12093–12103.
- Altun ZF, Hall DH (2011) Nervous system, general description. *WormAtlas*. doi.



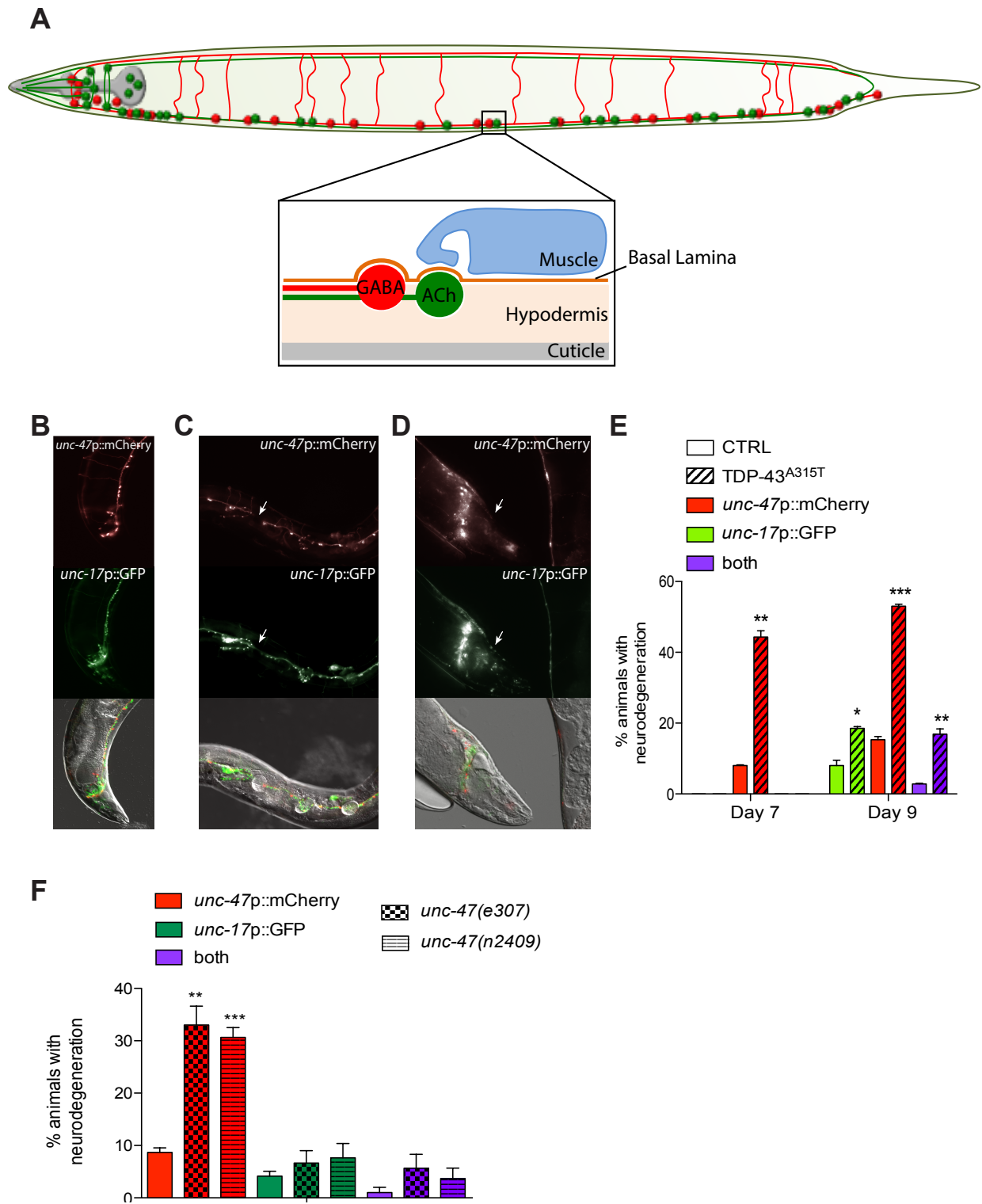
- Amin ND, Bai G, Klug JR, Bonanomi D, Pankratz MT, Gifford WD, Hinckley CA, Sternfeld MJ, Driscoll SP, Dominguez B, Lee K-F, Jin X, Pfaff SL (2015) Loss of motoneuron-specific microRNA-218 causes systemic neuromuscular failure. *Science* 350:1525–1529.
- Anderson P, Kedersha N (2009) Stress granules. *Curr Biol* 19:R397–R398.
- Bendotti C, Bao Cutrona M, Cheroni C, Grignaschi G, Coco Lo D, Peviani M, Tortarolo M, Veglianese P, Zennaro E (2005) Inter- and intracellular signaling in amyotrophic lateral sclerosis: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurodegener Dis* 2:128–134.
- Blum ES, Abraham MC, Yoshimura S, Lu Y, Shaham S (2012) Control of nonapoptotic developmental cell death in *Caenorhabditis elegans* by a polyglutamine-repeat protein. *Science* 335:970–973.
- Casula M, Iyer AM, Spliet WGM, Anink JJ, Steentjes K, Sta M, Troost D, Aronica E (2011) Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Neuroscience* 179:233–243.
- Couillault C, Pujol N, Reboul J, Sabatier L, Guichou J-F, Kohara Y, Ewbank JJ (2004) TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol* 5:488–494.
- Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ, Zanesi N, Crawford M, Ozer GH, Wernicke D, Alder H, Caligiuri MA, Nana-Sinkam P, Perrotti D, Croce CM (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:E2110–E2116.
- Gantier MP (2010) New perspectives in MicroRNA regulation of innate immunity. *J Interferon Cytokine Res* 30:283–289.
- Gerdts J, Brace EJ, Sasaki Y, DiAntonio A, Milbrandt J (2015) Neurobiology. SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD<sup>+</sup> destruction. *Science* 348:453–457.
- Gerdts J, Summers DW, Milbrandt J, DiAntonio A (2016) Axon Self-Destruction: New Links among SARM1, MAPKs, and NAD<sup>+</sup> Metabolism. *NEURON* 89:449–460.
- Gerdts J, Summers DW, Sasaki Y, DiAntonio A, Milbrandt J (2013) Sarm1-mediated axon degeneration requires both SAM and TIR interactions. *J Neurosci* 33:13569–13580.
- Hammarlund M, Jorgensen EM, Bastiani MJ (2007) Axons break in animals lacking beta-spectrin. *J Cell Biol* 176:269–275.
- Jorgensen EM (2005) GABA. *WormBook*:1–13.
- Kaul D, Habbel P, Derkow K, Krüger C, Franzoni E, Wulczyn FG, Bereswill S, Nitsch R, Schott E, Veh R, Naumann T, Lehnardt S (2012) Expression of Toll-like receptors in the developing brain. Alexopoulou L, ed. *PLoS ONE* 7:e37767.

- Lee H, Han S, Kwon CS, Lee D (2015a) Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell*:1–14.
- Lee JY, Lee JD, Phipps S, Noakes PG, Woodruff TM (2015b) Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) extends survival in the hSOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 12:90.
- Lehmann SM et al. (2012) An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* 15:827–835.
- Letiembre M, Liu Y, Walter S, Hao W, Pfander T, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Fassbender K (2009) Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. *Neurobiology of Aging* 30:759–768.
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389:870–876.
- Mukherjee P, Winkler CW, Taylor KG, Woods TA, Nair V, Khan BA, Peterson KE (2015) SARM1, Not MyD88, Mediates TLR7/TLR9-Induced Apoptosis in Neurons. *J Immunol*:1500953.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VMY (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130–133.
- Nguyen MD (2004) Exacerbation of Motor Neuron Disease by Chronic Stimulation of Innate Immunity in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroscience* 24:1340–1349.
- Olivieri F, Rippo MR, Prattichizzo F, Babini L, Graciotti L, Recchioni R, Procopio AD (2013) Toll like receptor signaling in “inflammaging”: microRNA as new players. *Immun Ageing* 10:11.
- Osterloh JM et al. (2012) dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. *Science* 337:481–484.
- Polymenidou M, Cleveland DW (2011) The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in ALS. *CELL* 147:498–508.
- Ravits JM, La Spada AR (2009) ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology* 73:805–811.
- Ren Z, Ambros VR (2015) *Caenorhabditis elegans* microRNAs of the let-7 family act in innate immune response circuits and confer robust developmental timing against pathogen stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:E2366–E2375.

- Schwab C, Arai T, Hasegawa M, Yu S, McGeer PL (2008) Colocalization of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 and huntingtin in inclusions of Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:1159–1165.
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Molecular Cell* 5:659–669.
- Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q (2015) MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget* 6:8474–8490.
- Summers DW, DiAntonio A, Milbrandt J (2014) Mitochondrial dysfunction induces Sarm1-dependent cell death in sensory neurons. *Journal of Neuroscience* 34:9338–9350.
- Taylor RC, Dillin A (2013) XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity. *CELL* 153:1435–1447.
- Therrien M, Rouleau GA, Dion PA, Parker JA (2013) Deletion of C9ORF72 Results in Motor Neuron Degeneration and Stress Sensitivity in *C. elegans* Dupuy D, ed. *PLoS ONE* 8:e83450.
- Trotta T, Porro C, Calvello R, Panaro MA (2014) Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *J Neuroimmunol* 268:1–12.
- Vaccaro A, Tauffenberger A, Aggad D, Rouleau G, Drapeau P, Parker JA (2012a) Mutant TDP-43 and FUS Cause Age-Dependent Paralysis and Neurodegeneration in *C. elegans* Petrucelli L, ed. *PLoS ONE* 7:e31321.
- Vaccaro A, Tauffenberger A, Ash PEA, Carlomagno Y, Petrucelli L, Parker JA (2012b) TDP-1/TDP-43 Regulates Stress Signaling and Age-Dependent Proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans* Lu B, ed. *PLoS Genet* 8:e1002806.
- van Oosten-Hawle P, Morimoto RI (2014) Organismal proteostasis: role of cell-nonautonomous regulation and transcellular chaperone signaling. *Genes & Development* 28:1533–1543.
- van Oosten-Hawle P, Porter RS, Morimoto RI (2013) Regulation of organismal proteostasis by transcellular chaperone signaling. *CELL* 153:1366–1378.
- Veriepe J, Fossouo L, Parker JA (2015) Neurodegeneration in *C. elegans* models of ALS requires TIR-1/Sarm1 immune pathway activation in neurons. *Nature Communications* 6:7319.
- Xu D, Tahara H (2013) The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. *Adv Drug Deliv Rev* 65:368–375.
- Zhang Y, Grant B, Hirsh D (2001) RME-8, a conserved J-domain protein, is required for endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 12:2011–2021.

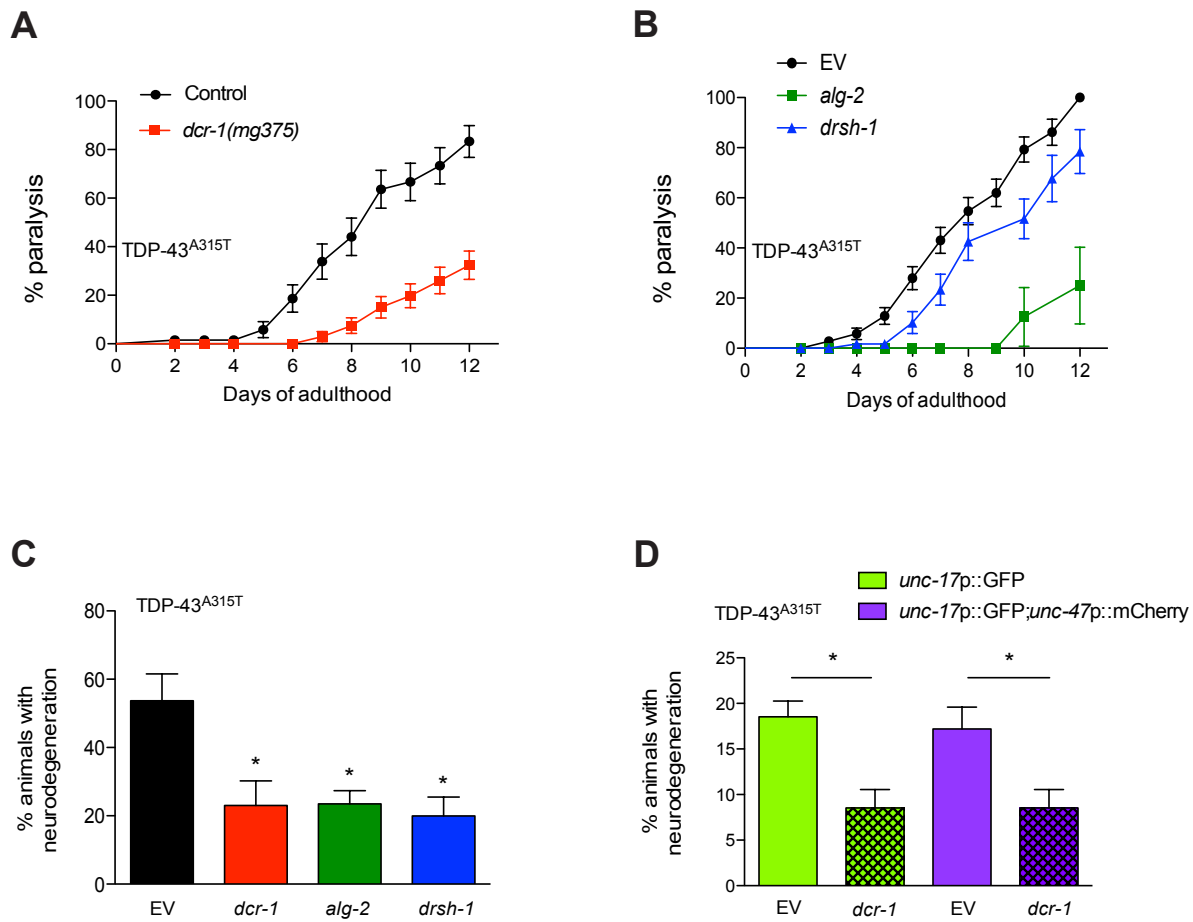
- Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien J-P, Appel SH (2010) Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* 58:231–243.
- Zou Y, Chiu H, Zinovyeva A, Ambros V, Chuang C-F, Chang C (2013) Developmental decline in neuronal regeneration by the progressive change of two intrinsic timers. *Science* 340:372–376.
- Zugasti O, Bose N, Squiban B, Belougne J, Kurz CL, Schroeder FC, Pujol N, Ewbank JJ (2014) Activation of a G protein-coupled receptor by its endogenous ligand triggers the innate immune response of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Immunol* 15:833–838.

# FIGURES



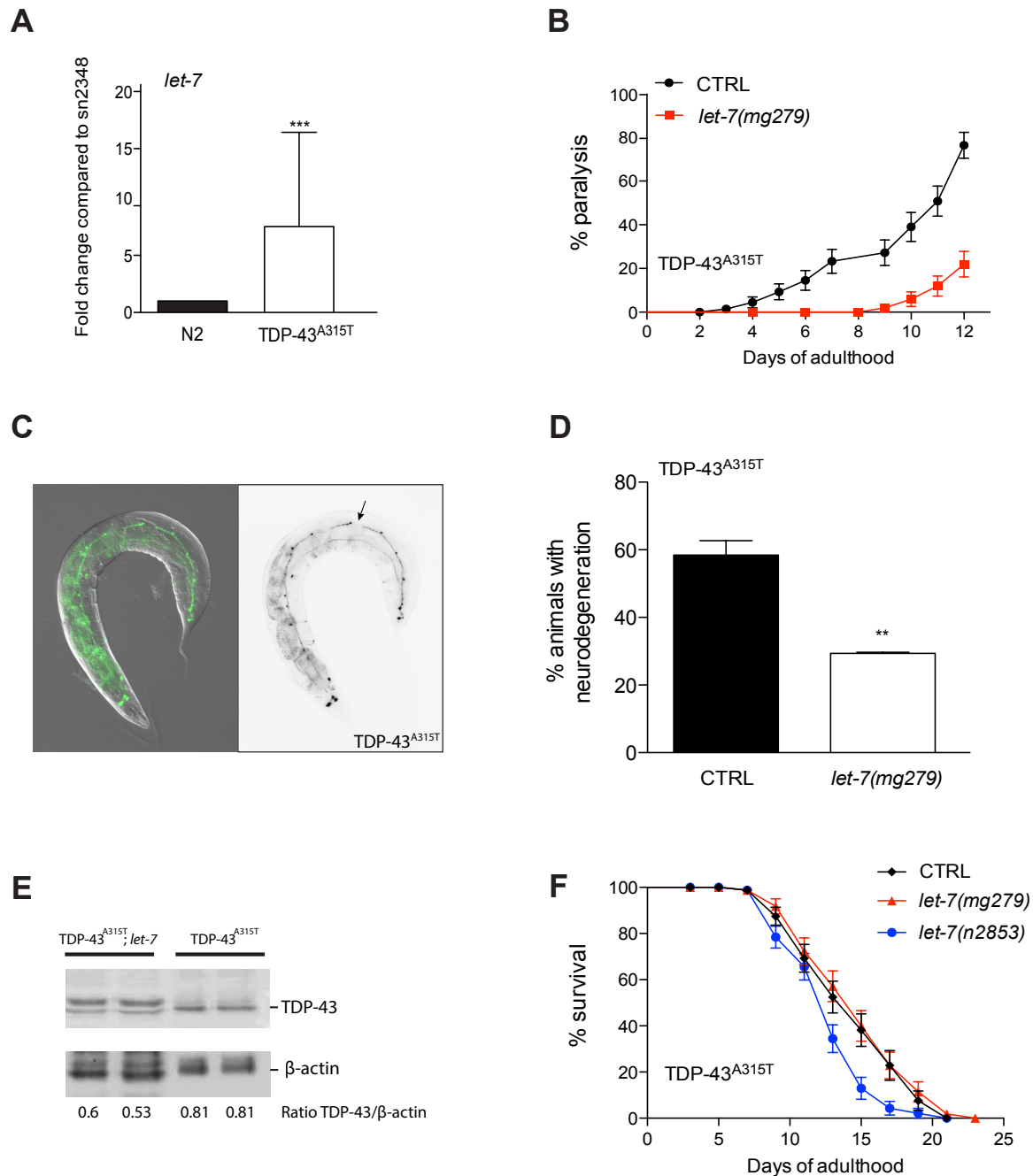
## Figure 1. Spread of GABAergic TDP-43-induced proteotoxicity

A, Top, Model of GABAergic (red) and cholinergic (green) system in a whole worm. Cholinergic network was simplified. Bottom, Proximity of GABAergic (red) and cholinergic (green) neurons between the basal lamina (orange line) and the hypodermis (beige). Ramifications of muscle cells (blue) branch to the neurons. Drawing inspired from Wormatlas [374]. B-D, Top panels are GABAergic neurons labelled in red (*unc-47p::mCherry*), middle panels are the cholinergic motor neurons in green (*unc-17p::GFP*), and bottom panels are merged DIC, GFP and mCherry images. B, Healthy *unc-17p::GFP; unc-47p::mCherry* control strain. C, TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-17p::GFP; unc-47p::mCherry* transgenic strain showing early degeneration (top arrow) at adult day 7 only in GABAergic neurons (*unc-47p::mCherry*). D, Neurodegeneration (arrows) at adult day 9 in both GABAergic (*unc-47p::mCherry*) and cholinergic (*unc-17p::GFP*) neurons in the nerve ring. E, Quantification of the neurodegeneration of *unc-17p::GFP* (Green), *unc-47p::mCherry* (Red) or both (Purple) at days 7 and 9 of adulthood with TDP-43<sup>A315T</sup> (striped) or not (not striped) (n<80). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (mean ± s.e.m). F. Quantification of axonal gaps induced by *unc-47(e307)* (n=88) and *unc-47(n2409)* mutants (n=88) or in controls (n=92) in transgenics worms expressing *unc-47p::mCherry* or *unc-17p::GFP*, or both, at day 9 of adulthood. t test, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



**Figure 2. TDP-43-dependent motor neuron degeneration requires microRNA processing genes.**

A, TDP-43<sup>A315T</sup>; *dcr-1(mg375)* (n=79) animals show decreased paralysis compared to TDP-43<sup>A315T</sup> controls (n=66 p<0.0001). B, RNAi against *alg-2* (n=61) or *drsh-1* (n=64) reduced paralysis in TDP-43<sup>A315T</sup> animals compared to EV controls (n=117). C, RNAi silencing of *dcr-1* (n=164), *alg-2* (n=102) or *drsh-1* (n=145) reduced the degeneration of GABAergic neurons in TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-47p::mCherry* transgenics compared to EV (n=275) controls. D, Reduced degeneration of cholinergic neurons (*unc-17p::GFP*, green), or in both cholinergic and GABAergic *unc-47p::mCherry* neurons (purple) following RNAi treatment with *dcr-1* (n=130) compared to EV controls EV (n=124), \*p<0.05. Means and s.e.m are represented.

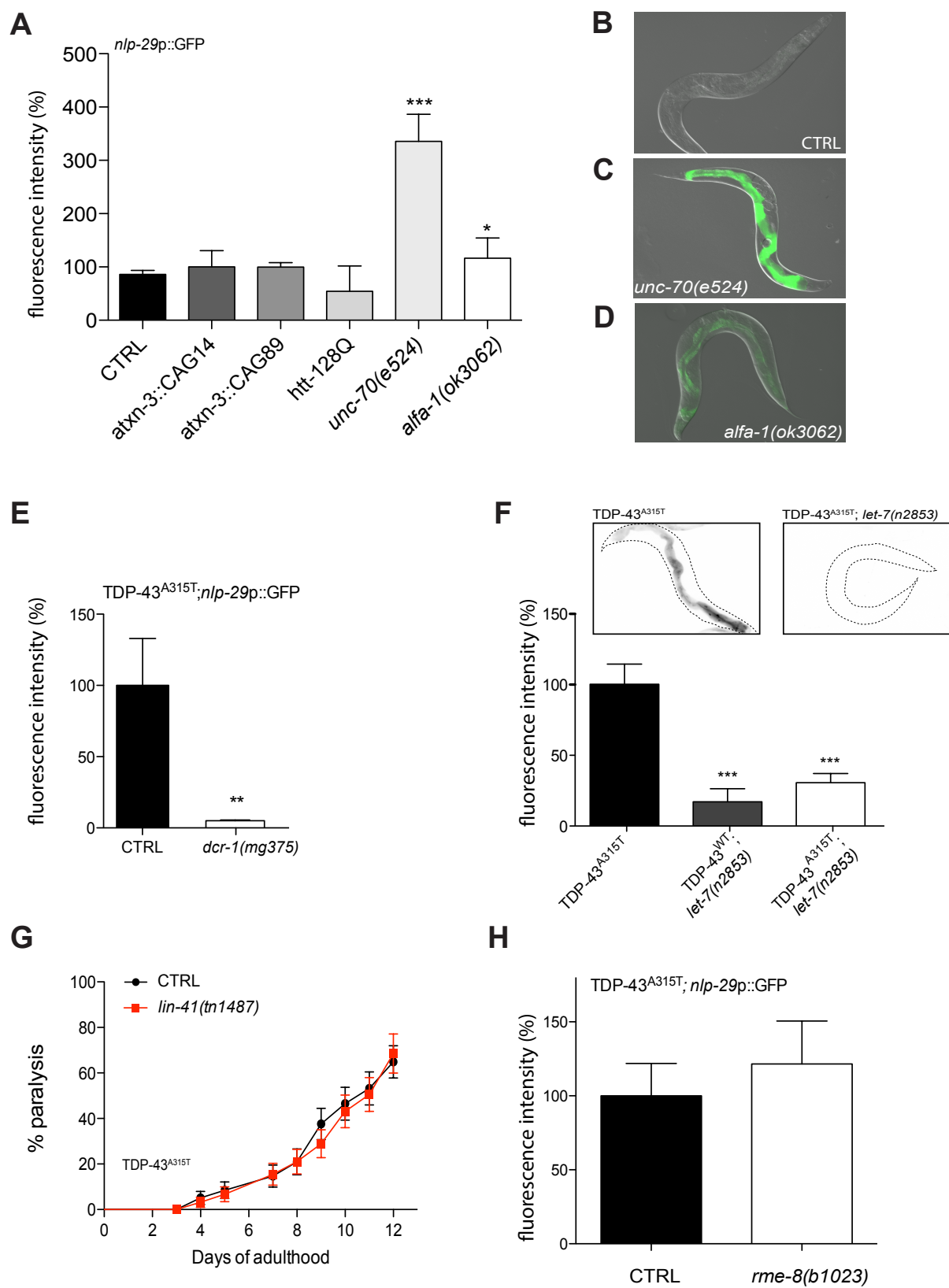


**Figure 3. *let-7* mutations suppress TDP-43 motor neuron toxicity.**

A, Relative quantification by Real Time PCR of *let-7\** (*let-7* 3p) in wild type N2 worms or in TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics. Experiment was performed 3 times in duplicates with synchronized day-2 adult worms. B, Decreased paralysis of TDP-43<sup>A315T</sup>; *let-7(mg279)* (n=60) strains compared to TDP-43<sup>A315T</sup> controls (n=71), \*\*\* p<0.0001. C, DIC and

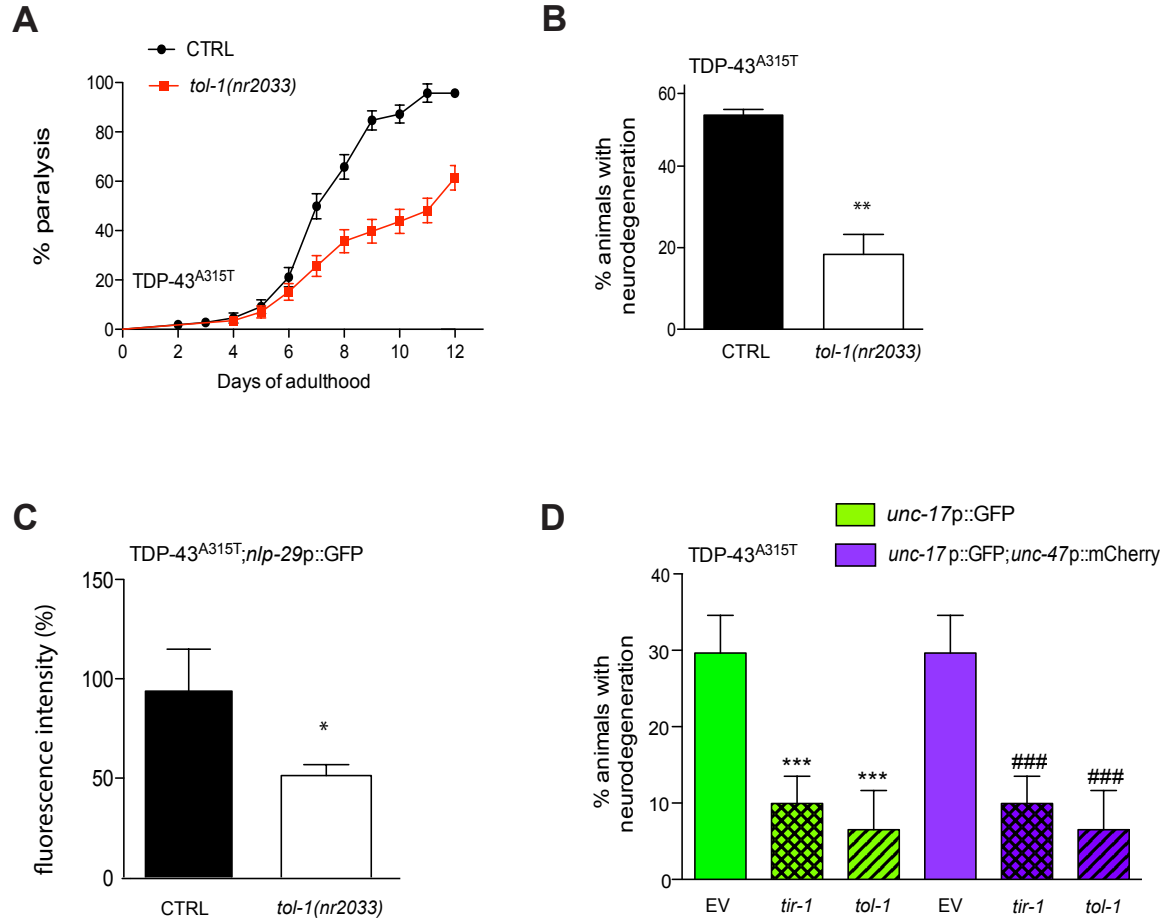


fluorescent images of a TDP-43<sup>A315T</sup>; unc-47p::GFP with an axonal break (arrow). Photo on the right is black and white, photo-reversed to aid visualization. D Quantification of GABA motor neuron degeneration at day 9 of adulthood TDP-43<sup>A315T</sup> transgenic controls (n=136) compared to TDP-43<sup>A315T</sup>; *let-7(mg279)* animals (n=146), \*\*p<0.01. Means and s.e.m are represented. E, Western Blot for TDP-43 in protein extracts from TDP-43<sup>A315T</sup>; *let-7(n2853)* or TDP-43<sup>A315T</sup> strains.  $\beta$ -actin quantification was used as a control. Ratio TDP-43/  $\beta$ -actin is shown. F, Comparison of TDP-43<sup>A315T</sup> strain (n=90) lifespan with TDP-43<sup>A315T</sup>; *let-7(mg279)* (n=90) and TDP-43<sup>A315T</sup>; *let-7(n2853)* (n=90, \*p<0,05). s.e.m are represented.



**Figure 4. let-7 is required for the activation of a proteotoxic immune response.**

A, Quantification of *nlp-29p::GFP* fluorescence (n=70) in *atxn-3::CAG14* (n=10), *atxn-3::CAG89* (n=14), *htt-128Q* (n=12) models, in axonal breaks model *unc-70(e524)* (n=17) and in C9ORF72 orthologue in *C. elegans alfa-1(ok3062)* (n=21). \*p<0,05, \*\*\*p<0,001. t test performed, s.e.m. are represented. B-D, Photo in DIC and fluorescence illustrating *nlp-29p::GFP* expression in CTRL (B) or crossed with *unc-70(e524)* (C) or *alfa-1(ok3062)* (D). E, Quantification of *nlp-29p::GFP* fluorescence in TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP* (n=73) versus *dcr-1(mg375)*; TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP* (n=69) worms at day 9 of adulthood, p=0.0013. F, Quantification of GFP fluorescence for TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP* (n=22), TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP*; *let-7(n2853)* (n=30) and TDP-43<sup>WT</sup>; *nlp-29p::GFP*; *let-7(n2853)* (n=22) strains. Black & white, photo reversed images of TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP* (left) and TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP*; *let-7(m2853)* (right, worm is outlined) strains.\*\*\* p<0.001 compared to TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP*. G, Paralysis test on TDP-43<sup>A315T</sup> transgenic line with *lin-41(tn1487)* mutation (n=70) or not (n=65) conducted at 15°C. H, Quantification of the fluorescence in TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP* in control (n=13) versus *rme-8(b1023)* (n=13) worms at day 9 of adulthood. Means and s.e.m are represented.



**Figure 5. TOL-1 is required for the transcellular TDP-43<sup>A315T</sup> proteotoxicity.**

A, TDP-43<sup>A315T</sup>; *tol-1(nr2033)* (n=112) animals show less paralysis than TDP-43<sup>A315T</sup> control strains (n=108), p<0.0001. B, Quantification of axon degeneration in TDP-43<sup>A315T</sup>; *tol-1(nr2033)* strains compared to TDP-43<sup>A315T</sup> alone, n=100, \*\* p<0.01. C, Decreased GFP fluorescence in TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP*; *tol-1(nr2033)* animals (n=15), versus TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP* controls (n=19), \*p=0.02. D, Neurodegeneration at day 9 of adulthood in TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-17p::GFP*; *unc-47p::mCherry* strain counting axonal breaks in cholinergic neurons (green) or cholinergic and GABAergic neurons (purple) treated with EV (n=78), *tir-1* (n=104) or *tol-1* (n=78) RNAi. \*\*\*p<0.001 compared to *unc-17p::GFP* treated with EV and ###p<0.001 compared to *unc-17p::GFP;unc-47p::mCherry* treated with EV. Means and s.e.m are represented.

**A**

	TOL-1	DCAR-1
<i>let-7</i>	0,93	0,78
<i>let-7*</i>	0,94	0,61
<i>miR-51</i>	0,71	0,51
<i>miR-51*</i>	0,73	0,38

**B**

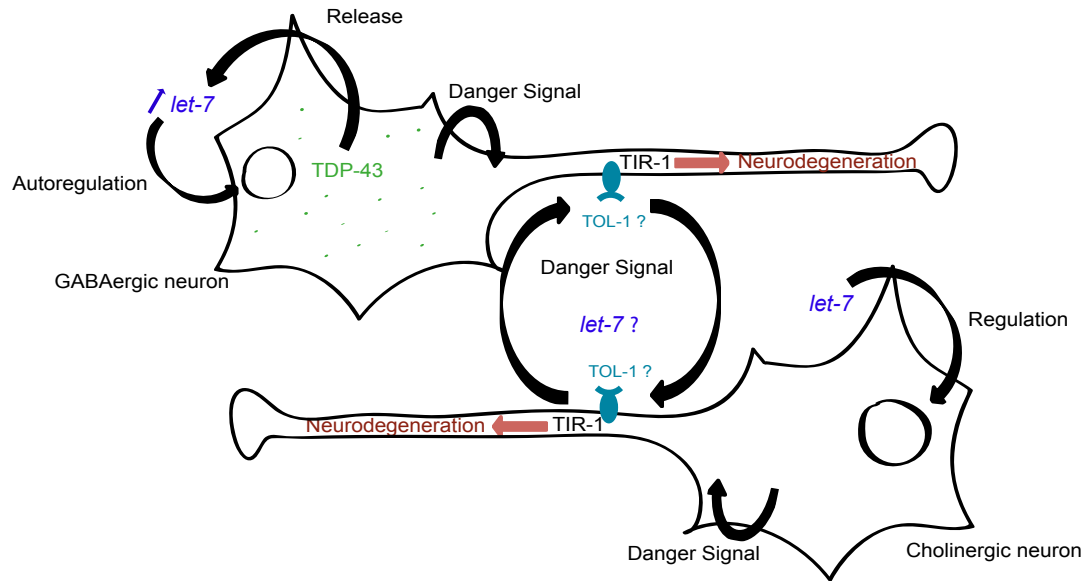
```

1  M R R K M K L F L F L L L V I N I C R S A A A N G D
27 E C P K F C K C A P D P V Q P T S K L L L C D Y S S
53 K N T T I T P I A S S N Y D Q V A N I R S L F I S C
79 D N N N F Q F P D A Y F K S L T A L H H L R I V G C
105 E T T H F S V K L F E D L A A L R R L E L D Q I S T
131 A S T S F E M T E D V L M P L A R L E K F S L T R S
157 R N I E L P Q R L L C S L P H L Q V L N I S S N E L
183 P S L R R E E S C V A Q Q L L I V D L S R N R L T N
209 I E Q F L R G I P A I R Q I S V A Y N S I A E L D L
235 S L A T P F L Q Q L D A E A N R I V D L T S L P G T
261 V V H V N L A G N A L K R V P D A V A E L A S L V A
287 L N V S R N E I E A G N S S V F S S P E L E M L D A
313 S Y N K L D S L P V E W L Q K C E K R I A H L H L E
339 H N S I E Q L T G G V L A N A T N L Q T L D L S S N
365 Q L R V F R D E V L P E N S K I G N L R L S N N S L
391 E L L E P S S L S G L K L E S L D L S H N K L T E V
417 P A A I G K V E Q L K K V D L S H N R I A K V Y Q Y
443 V L N K I K Q L H T V D L S N N Q L Q S I G P Y I F
469 S D S S E L H S L D V S N E I S L L F K D A F A R
495 C P K L R K I S M K M N K I K S L D E G L T E A S G
521 L R R L D V S H N E I L V L K W S A L P E N L E I L
547 N A D N N D I N L L T A A S M S P S T A N L K S V S
573 L S N N G I T I M N A D Q I P N S L E S L D V S N N
599 R L A K L G K T A L A A K S Q L R R L N L K G N L L
625 T V V A T E S M K V V E A V H P L K V E I S E N P L
651 I C D C Q M G W M I G G A K P K V L I Q D S E T A S
677 C S H A V D G H Q I Q I Q S L S K K D L L C P Y K S
703 V C E P E C I C C Q Y G N C D C K S V C P A N C R C
729 F R D D Q F N I N I V R C H G N S S M V P K R E F V
755 V S E L P V S A T E I I L S G V T L P Q L R T H S F
781 I G R L R L Q R L H I N G T G L R S I Q P K A F H T
807 L P A L K T L D L S D N S L I S L S G E E F L K C G
833 E V S Q L F L N G N R F S T L S R G I F E K L P N L
859 K Y L T L H N S L E D I P Q V L H S T A L S K I S
885 L S S N P L R C D C S G G S Q Q H L H H R R D P K A
911 H P F W E H N A A E W F S L H R H L V V D F P K V E
937 C W E N V T K A F L T N D T T V L S A Y P P N M G N
963 D V F V M P I E E F L R D Y N S T I C V P F S S G F
989 F G Q D P Q N S I L F V I I T I S I A V L L C V L V
1015 I L A I S F I R K S H D A I N Q R R Y K A S S L N C
1041 S T S A G S S P L P V P L L S Y H A F V S Y S K K D
1067 E K M V I D Q L C R P L E D E D Y Q L C L L H R D Y
1093 P T Y C S N L H A I S D E L I A Q M D S S Q C L I L
1119 V L T K H F L E N E W K T L Q I K T S H Q L F A K N
1145 R A K R V I A V L G D G V D A N L L D D E L G Q I L
1171 R K H T R I E M R S H L F W T L L H S S L P S R L P
1197 L P S N S G D D S S Q L Y S D I Y G I V P S D V V

```

**Figure 6. Prediction of let-7 binding to TOL-1.**

A, Prediction of microRNA let-7 or miR-51 and their 3P sequences binding to TOL-1 or DCAR-1 receptors in *C. elegans*. Predictions are based on Support Vector Machine (SVM) from RPISeq (<http://pridb.gdc.b.iastate.edu/RPISeq>) trained and based on two non-redundant datasets of RNA-protein interactions. Values close to 1 are highly statistically probable. miR-51, expressed during development and highly expressed in pharynx, is used as negative control. B, TOL-1 protein sequence. Predictions from RNABindRPlus interface, which combined SVM predictions and homology-based method, of RNA-binding site are red marked. In yellow is the TIR ultra-conserved domain.



**Figure 7. Model of *let-7* mediated motor neuron degeneration.**

TDP-43-induced GABAergic neurodegeneration *via* TIR-1 is observed in cholinergic motor neurons through a release of a danger signal. We propose that *let-7* acts in a non-cell autonomous manner, potentially by binding TOL-1 receptor to drive neurodegeneration.

### **III. Discussion**

Lors de ces études plusieurs grands axes concernant la sclérose latérale amyotrophique ont été investigués, à savoir la dégénérescence des motoneurones, la propagation trans-cellulaire et les réactions intra-cellulaires en réponse à un signal de danger. Nous allons reprendre ces axes pour la discussion et y inclure une réflexion sur les approches thérapeutiques potentielles.

#### **III. 1. LA DÉGÉNÉRESCENCE DES NEURONES MOTEURS DANS LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE**

Nous savons que dans la SLA, les protéines ubiquitaires, telles que TDP-43 et FUS, entraînent une dégénérescence principalement des motoneurones, mais le mécanisme cytotoxique est inconnu. Dans nos modèles chez *C. elegans*, afin d'éviter des phénomènes de létalité, nous avons exprimé les gènes codant pour les protéines humaines TDP-43 ou FUS uniquement dans un type neuronal : les neurones GABAergiques. Ceci n'est pas dénué de sens puisque les neurones GABAergiques sont touchés par la pathologie ; le niveau du neurotransmetteur GABA est anormal dans le sérum et la quantité de récepteurs GABA<sub>A</sub> est diminuée dans le cortex moteur et la moelle-épinière des patients ayant la SLA [375,376]. De plus, selon le type de la sous unité  $\alpha$  des récepteurs GABA<sub>A</sub> présents sur les neurones, ceux-ci sont plus résistants ou plus vulnérables à la dégénérescence [377]. La principale faille de nos modèles de SLA chez *C. elegans* est le fait que les transgènes soient exprimés en copies multiples dans le génome. Cependant, afin de palier à une toxicité potentielle venant de la pluralité des copies de TDP-43 ou de FUS, nous avons comparé les TDP-43<sup>A315T</sup>/FUS<sup>S57Δ</sup> avec des transgènes «sauvages » (TDP-43<sup>WT</sup>/FUS<sup>WT</sup>) également exprimant les gènes en multiples copies. Pour l'analyse de la dégénérescence des différentes souches de ver, nous avons opté pour le test de paralysie en culture solide, parfois vérifié avec un test automatisé par un « Worm MicroTracker » qui compte le nombre de mouvements d'un groupe de ver par minute pendant un laps de temps défini. Afin de vérifier que la paralysie est due à une dégénérescence des motoneurones et non pas à une autre cause intrinsèque,



nous avons utilisé le test de neurodégénérescence basé sur la fluorescence GFP observée dans les neurones GABAergiques. Pour ce dernier test, il est à considérer la possibilité que l'absence de fluorescence que l'on attribue à une lésion axonale puisse relever d'une absence de protéine fluorescente à cet endroit et non d'une cassure du neurone. Néanmoins, l'utilisation comme contrôle de la souche *unc-47p::GFP* nous a permis de vérifier la faible probabilité de ce type de phénomène.

Sachant que TDP-43 ou FUS sont des protéines ubiquitaires, pourquoi les motoneurones sont spécifiquement atteints dans la SLA ? Serait-ce une histoire de pH ?

Les études observant une variation de la quantité de microARNs dans l'environnement extracellulaire [352,378] ouvrent la perspective qu'une variation de pH pourrait être une cause de mort cellulaire. En effet, une variation de pH intracellulaire modifie bon nombre de processus métaboliques tels que la glycolyse, la synthèse protéique, la synthèse d'ADN et on observe également une condensation de la chromatine, une polyadénylation des ARNs messagers [379,380]. Un environnement acide, entre autres, diminue la recapture de glutamate, entraîne une activation gliale, un stress du RE, une diminution de la synthèse d'ATP et une vacuolisation mitochondriale, des phénomènes observés dans des cas de SLA [381]. De plus, les transitions métaboliques requérant un changement de pH nécessitent aussi une variation de calcium. Or, nous avons démontré dans une étude ultérieure que la dérégulation calcique était indispensable au processus de nécrose dans le cas d'une protéotoxicité induite par TDP-43<sup>A315T</sup> chez *C. elegans* [144] (Annexe 1), cela étant appuyé par une autre étude liant l'augmentation calcique à la nécrose *via* une acidification intracellulaire [382]. Fait intéressant, une étude réalisée sur des souris SOD1<sup>G93A</sup> a montré que les souris développent une acidose progressive du système nerveux central, associée à de multiples altérations métaboliques également présentes lors d'autopsies de patients ayant la SLA [381]. De plus, et non des moindres, l'acidose semble ne pas être une conséquence, mais bien un facteur modulateur de la progression de la maladie. En outre, une étude clinique utilisant des composés acides ont observé une accélération de la défaillance pulmonaire chez les patients ayant la SLA [383]. Une autre étude clinique traitant les patients ayant la SLA au topiramate, un inhibiteur d'une enzyme tampon du pH, l'anydrase carbonique, a permis d'observer un déclin de la force musculaire

[384]. Ainsi, les molécules acides que sont les microARNs, non par leur spécificité, mais davantage par la variation de leur quantité peuvent faire varier le pH et avoir de graves conséquences cellulaires et tissulaires. Nous avons discuté dans la section 1.3.3.2. de l'hypothèse d'une baisse générale des microARNs, mais il faut faire la distinction entre une variation péri-cellulaire/péri-synaptique dont nous parlions dans ce paragraphe et une variation à l'échelle de l'organisme global – sérum, LCR, etc.

Les processus impliquant les microARNs au niveau des neurones qui dégénèrent restent à être investigués, mais il y a en effet bon espoir que cela donne des résultats concluants. Comme nous avons mentionné dans l'introduction, la protéine Dicer entre autres joue un rôle dans la bonne fonctionnalité neuronale. Une délétion d'une partie de la séquence de son gène dans les cellules de Purkinje du cervelet chez la souris entraîne une dégénérescence cérébelleuse chronique. Si cette délétion est réalisée uniquement dans les autres types neuronaux, les constatations sont les mêmes [385-388]. Encore une fois, si des mutations sont présentes dans le gène codant pour Dicer uniquement dans les astrocytes [389], les oligodendrocytes [390] ou les cellules de Schwann [391,392], une neurodégénérescence est également observée. Il est à noter que Dicer n'est pas spécifique à la biogénèse des microARNs et que donc les conclusions ne peuvent être tirées au niveau de ce sous-groupe d'ARNs. Néanmoins, des observations similaires ont été faites par exemple si le gène codant pour la protéine DCRG8 – propre à la biogénèse des microARNs – est muté [393-395].

Une hypothèse évolutive veut que les microARNs seraient présents afin de supprimer les transcrits reliquats d'une étape développementale précédente pour « nettoyer » l'organisme (Pour revue : [280]). Nous avons parlé dans l'introduction de la stabilité des microARNs dans les fluides corporels ; ils sont cependant hautement régulés par divers procédés. Certains facteurs entrent en ligne de compte dans le renouvellement accéléré des microARNs pouvant les empêcher de jouer correctement leurs rôles. Il s'agit entre autres de virus, d'interactions avec d'autres microARNs, ou de protéines de dégradation (Pour revue : [396]). Des ribonucléases sont enrôlées dans la dégradation spécifique de microRNAs, telles que des SDNs (small RNA degrading nuclease) chez *Arabidopsis* [397], XRN-1 (5'-3' exoribonuclease -1) et XRN-2 (5'-3' exoribonuclease -2)

chez *C. elegans* et Xrn-1 (5'-3' exoribonuclease -1), PNPase (Polynucleotide phosphorylase) et RRP4 (Ribosomal RNA processing -4) chez l'Homme [396]. De plus, l'enzyme DCS-1 (Decapping scavenger enzyme -1), orthologue de la protéine DcpS humaine, permet une modulation du renouvellement (« turnover » en anglais) des microARNs [398,399]. Elle interagirait même avec XRN-1 chez *C. elegans* afin de promouvoir la dégradation des microARNs. Cette régulation est essentielle puisque retrouvée dans toutes les espèces et très active dans les neurones [396].

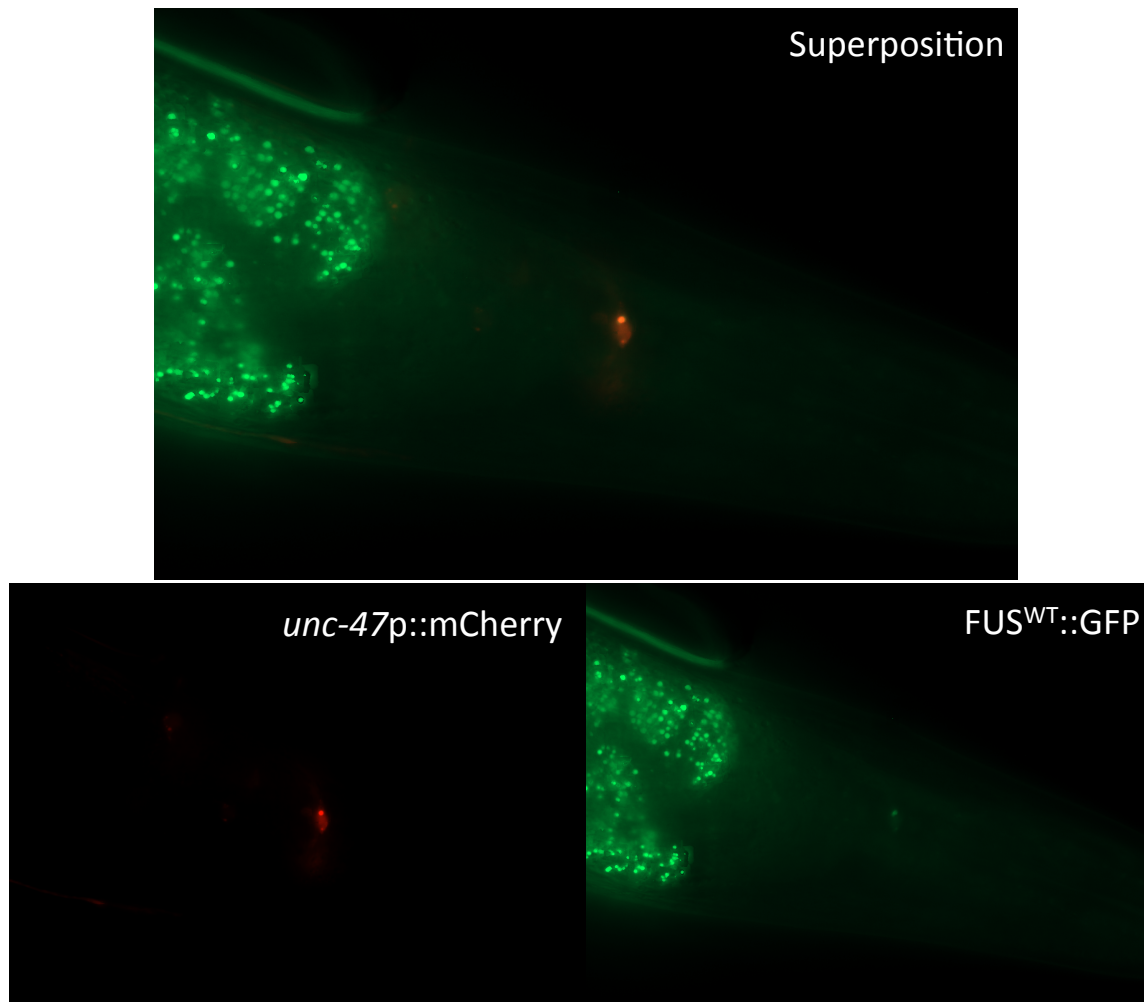
### III. 2. LA PROPAGATION TRANS-CELLULAIRE

Afin d'étudier le phénomène de propagation d'un signal de danger, nous avons commencé par bloquer l'exocytose générale - pas seulement au niveau synaptique - des neurones. Pour cela nous avons utilisé deux mutants chez *C. elegans* pour les gènes *unc-31*, codant pour une protéine permettant la fusion de vésicules à cœur dense libérant des neuropeptides à la membrane et *unc-13*, codant pour des protéines pré-synaptiques permettant le relâchement de neurotransmetteurs par des petites vésicules claires [400,401]. Nous avons montré qu'une perte de fonction des protéines associées à ces gènes menait à une diminution de la protéotoxicité induite par TDP-43<sup>A315T</sup> et l'activation paracrine et autocrine de la voie TIR-1. De manière particulièrement intéressante, des variants pour *UNC-13A* ont été montrés diverses fois pour être associés à la SLA [252,253] et même à la DFT. En outre, le variant rs12608932 entraîne une longévité écourtée [252]. Dans cette thèse, il a été très peu mentionné de la DFT, qui pourtant semble de plus en plus être la même maladie que la SLA, partageant toutes deux un spectre de gènes causatifs commun et des mécanismes similaires. Nous nous sommes focalisés sur la SLA par souci de clarté et puisque les phénotypes observés chez le ver dans nos modèles sont semblables à ce que l'on peut observer chez un patient ayant la SLA, comparativement à une DFT.

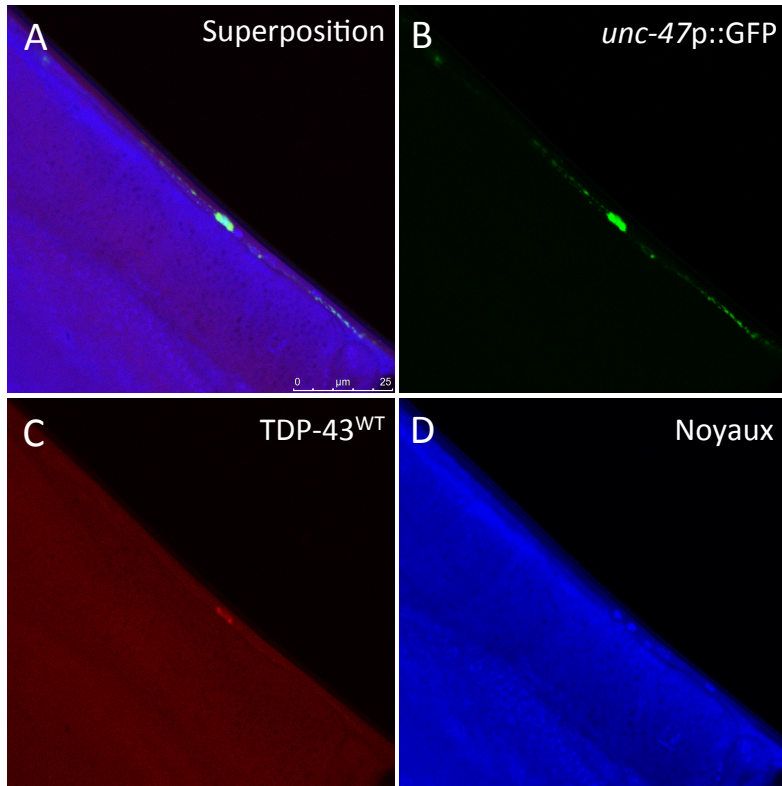
Après avoir montré que dans nos modèles existait aussi un mécanisme inter-cellulaire de communication, nous nous sommes concentrés sur la possibilité que la molécule signale puisse être un microARN. Néanmoins, il est fort possible que d'autres molécules soient mises en jeu, et jusqu'à la propagation même de TDP-43<sup>A315T</sup> ou FUS<sup>S57A</sup>.

Nous avons dans notre laboratoire une souche de ver possédant la protéine humaine FUS<sup>WT</sup> liée directement à la GFP. Son gène est également exprimé sous le contrôle du promoteur *unc-47* et a été inséré en une simple copie. Nous avons fait des clichés afin de vérifier sa localisation en utilisant un marqueur fluorescent rouge mCherry dans les neurones GABAergiques (Figure 16). En ce qui concerne la fluorescence GFP, nous voyons un bruit de fond dans le pharynx qui correspond à la bactérie *E. Coli* autofluorescente dans le vert, ingérée par le nématode. Le signal est aussi fort pour nous permettre de voir la fluorescence de FUS (en copie simple). Nous voyons que FUS<sup>WT</sup> colocalise dans le neurone GABAergique et ne semble pas être exocytée. Cependant, nous n'avons pas de marqueur du noyau pour voir la localisation sub-cellulaire de FUS. De plus, malheureusement, nous n'avons pas de souche FUS mutante pour comparer une éventuelle mauvaise localisation de la protéine.

Nous avons également tenté de faire un marquage immunohistochimique sur tissu fixé de ver en utilisant un anticorps contre TDP-43. Chez *C. elegans*, il est très difficile d'obtenir de bons résultats, et ce pour plusieurs raisons. La première étant que très peu d'anticorps ciblant des protéines de ver sont sur le marché actuellement. Cela n'était pour nous pas un problème puisque les protéines que nous voulions reconnaître sont d'origine humaine. Qui plus est, la perméabilisation et la fixation ne sont pas aisées. D'après les résultats obtenus pour TDP-43<sup>WT</sup>, nous pouvons affirmer que cette protéine est bien exprimée dans les neurones GABAergiques et ne semble pas être relâchée par ces neurones, bien que le marquage ne soit pas idyllique (Figure 17). En effet le marquage au Topro (marquant les noyaux) et l'anticorps secondaire se fixent un peu de manière non spécifique (Annexe 3 : Protocole de l'immunomarquage révélant TDP-43). Nous avons réalisé la même expérience avec des vers TDP-43<sup>A315T</sup> (Figure 18). La constatation est la même bien que le marquage de TDP-43 laisse à désirer. Il semblerait pour autant que TDP-43 soit uniquement dans les neurones GABAergiques et ne se disperse pas. De là à conclure quant à sa sub-localisation cellulaire, ce n'est pas encore possible. Il faudrait optimiser la technique de perméabilisation, de fixation et tester d'autres anticorps secondaires.

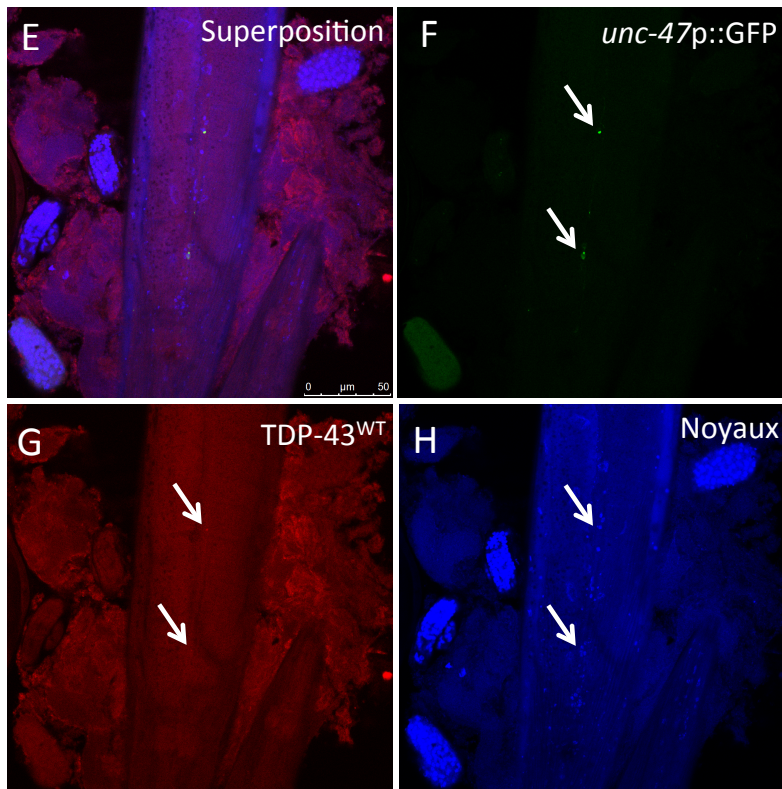


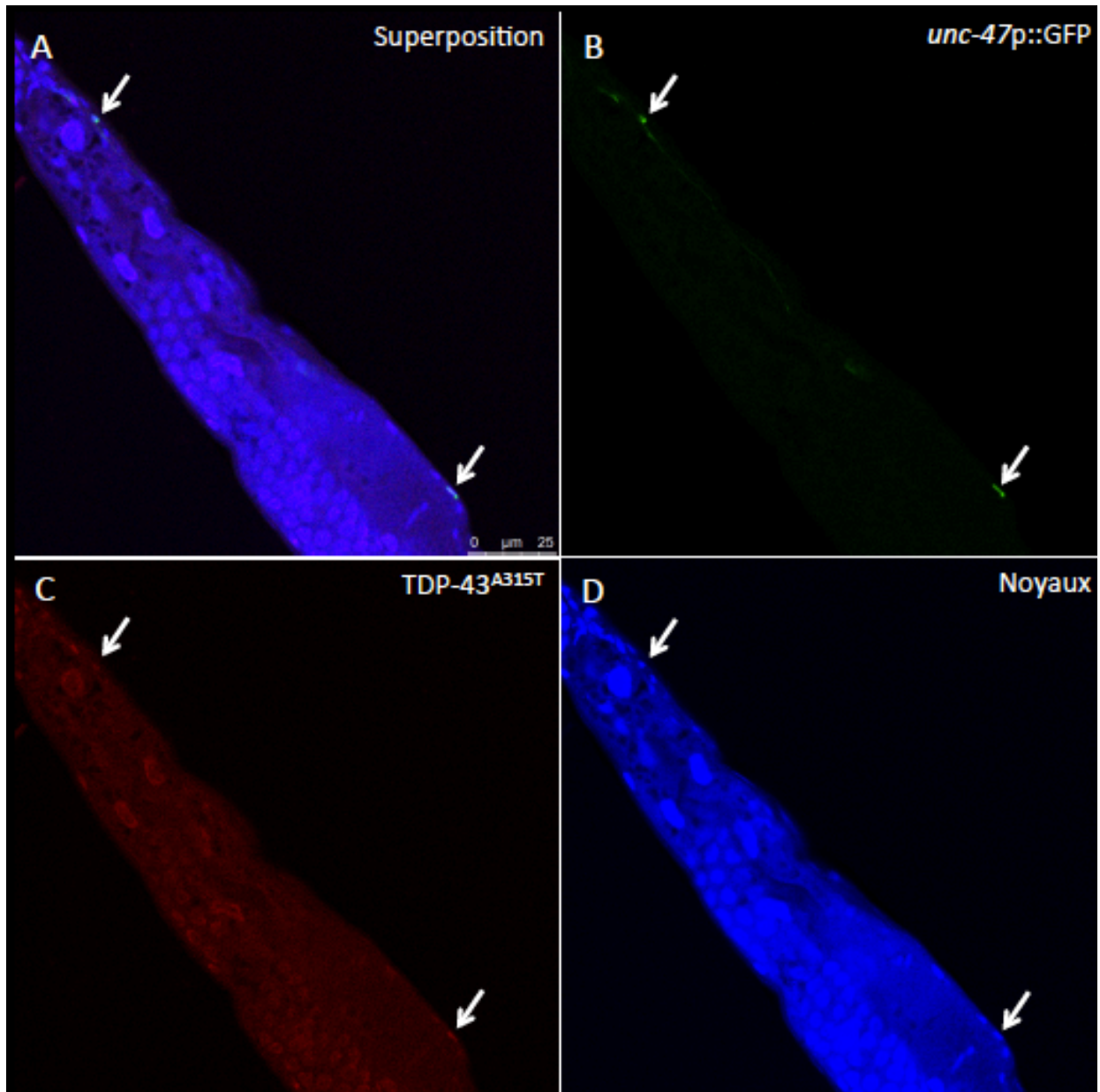
**Figure 16 : Localisation de FUS dans les neurones GABAergiques.** Photographie prise au microscope à épifluorescence Zeiss Observer 2.0 à l'objectif 63x à l'huile. En rouge un neurone GABAergique dans la tête du ver (en bas à gauche), en vert la protéine FUS<sup>WT</sup>::GFP (en bas à droite) et une superposition des images (« merge ») en haut.



**Figure 17 : Localisation de TDP-43<sup>WT</sup> dans les neurones GABAergiques.**

Images prises au microscope confocal (A-D, 100x; E-H, 63x) illustrant la fluorescence GFP des neurones GABAergiques (B, F), la fluorescence rouge Alexa Fluor 594 correspondant à la localisation de TDP-43 (C, G) et les noyaux révélés par le Topro (D, H). Les colocalisations sont représentées sur les figures de F à G. Protocole en annexe 3.





**Figure 18: Localisation de TDP-43<sup>A315T</sup> dans les neurones GABAergiques.** Photographies prises au confocal à 63x (A-D) illustrant la fluorescence GFP des neurones GABAergiques (B), la fluorescence rouge Alexa Fluor 594 correspondant à la localisation de TDP-43 (C) et les noyaux révélés par le Topro (D).



Ces résultats semblent indiquer, bien qu'ils manquent de consistance, que TDP-43 soit cantonnée aux neurones GABAergiques. Ils appuieraient néanmoins notre hypothèse selon laquelle d'autres molécules servent de signal de danger ; les microARNs potentiellement.

Comme nous l'avons vu, près de 500 microARNs sont sur- ou sous-exprimés dans le cas pathologique de la SLA (Tableau 1). Néanmoins ces résultats n'ont de valeur que si la quantification relative des microARNs a été réalisée avec une normalisation utilisant un contrôle endogène stable et suffisamment en abondance. Il n'est pas aisé de comparer des résultats dont les paramètres appliqués pour les obtenir ont été différents. Ainsi, le contrôle endogène U6 utilisé dans une majorité des études a été montré en 2014 pour être trop variable entre les individus mais également au niveau d'un même échantillon après plusieurs décongélations [402]. Comme certains articles le font, nous avons tenté une normalisation par une moyenne de 2 contrôles endogènes différents supposés stables pour les échantillons de patients: U54 et RNU24. Néanmoins, le contrôle RNU24 seulement variait moins entre les échantillons que la moyenne des deux, alors nous nous en sommes tenus à ce contrôle endogène. Quant aux échantillons issus de *C. elegans*, nous avons utilisé *sn2348*, stable également. Parfois le biais entre les études vient des statistiques employées. Par exemple les études du Dr. Campos-Melo en 2013 utilisent un t-test alors que beaucoup d'autres – nous y compris - utilisent un test de Mann-Whitney [343]. En effet, une comparaison de 2 échantillons indépendants ayant une distribution normale ou de N supérieur à 30 requerrait un test paramétrique t de Student. Néanmoins dans la configuration d'une comparaison de 2 échantillons indépendants de distribution non normale ou de N inférieur à 30 (ce qui est notre cas puisque nous regardons des expériences indépendantes que nous avons réalisées en duplicats), un test non paramétrique de Mann-Whitney s'impose. Les deux tests étant établis différemment, les résultats sont forcément divergents. Les tests non paramétriques sont moins stricts quant aux paramètres de la population dont a été extrait l'échantillon. Notamment, le test de Mann-Whitney considère les rangs, c'est à dire l'ordre d'apparition des résultats, ce qui est notre cas. Qui plus est les contrôles endogènes peuvent varier : let-7a par exemple dans la publication de Campos-Melo en 2013, a été montré stable dans certaines espèces comme les



bovins [403], mais que nous-mêmes avons trouvé variable. Il est donc de mise à émettre une réserve quant aux résultats observés [343].

Il est à noter que l'on observe une augmentation du microARN let-7 comparativement aux vers N2 pour des vers à 2 jours de vie adulte. Cependant, la variabilité obtenue pour les vers TDP-43<sup>A315T</sup> est grande et peut avoir plusieurs causes. Premièrement, les extraits d'ARNs n'étaient pas les mêmes, par conséquent, malgré la volonté d'avoir uniquement des vers à 2 jours de vie adulte, il est possible que des larves se soient immiscées dans les échantillons. Or, nous avons vu que la quantité de let-7 est absente aux premiers stades développementaux et augmente drastiquement à la fin de la vie larvaire [404]. Un biais existe peut-être à ce niveau. De plus, nous avons été obligés, pour synchroniser les vers, d'utiliser du FUDR (Fluorodeoxyuridine), une molécule bloquant la reproduction, mais accroît la longévité [405], et par conséquent possiblement agit sur la production de microARNs. Enfin, les amorces utilisées pour la qPCR provenaient de lots différents. La qPCR étant très sensible, là encore il a pu y avoir une variabilité de la quantité de let-7 dans les échantillons. Cependant nous sommes confiants dans nos résultats puisque les contrôles endogènes ont été vérifiés stables. De plus, nous avons quantifié let-7 dans des échantillons de vers mutants pour *tdp-1* (*tdp-1(ok803)*), l'orthologue de TDP-43 chez le ver (résultats non présentés). Ainsi l'absence de TDP-1 entraîne aussi une augmentation de let-7 à jour 2 de vie adulte de 5 fois par rapport aux vers N2 (quantification relative par rapport à *sn2343*, comme pour TDP-43).

Nos résultats mettent le microARN let-7 en avant comme modulateur de la pathologie dans notre modèle chez *C. elegans*. Néanmoins, nous avons généreusement reçu, de la part de Guy Rouleau et Christine Vande Velde, des cellules lymphoblastoïdes de patients sains et ayant la SLA afin de quantifier le microARN let-7 (Annexe 4). Nous connaissons le génotype des patients, à savoir s'ils avaient une mutation dans *TARDBP*, *FUS*, ou une expansion dans *C9ORF72*, et nous avons quantifié différents sous-types de let-7 : let-7a, let-7b et let-7i. En effet, let-7a et let-7b sont fortement exprimés dans le cerveau humain, le foie, le cœur et les muscles squelettiques [285]. De plus, l'expression de let-7b et let-7i est augmentée lors d'une infection à prion dans une culture neuronale de souris, ainsi

que dans les exosomes qui en dérivent [406]. Finalement, let-7 a déjà été montré comme régulateur de la neurodégénérescence [308]. Les résultats nous montrent une augmentation de let-7a et let-7i dans les lymphoblastes de patients ayant une mutation dans le gène codant pour TDP-43 (Annexe 4). Une augmentation de let-7a est également observée chez les patients ayant une mutation dans FUS tandis qu'une tendance à la hausse non significative est observée en ce qui concerne let-7i. Finalement, nous n'avons pas de variation en ce qui concerne let-7b. Sur les deux échantillons de patients ayant une expansion dans *C9ORF72*, nous n'avons pas été capable de détecter le microARN let-7b, d'où la significativité, néanmoins nous ne pouvons tirer de conclusion à partir de ces deux seuls échantillons. Ces résultats sont en concordance avec la hausse de let-7 que nous avons observé chez le ver (Manuscrit 2, Figure 2a). Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution du fait que nous avons quantifié let-7 dans des cellules qui normalement ne sont pas atteintes par la maladie. Qui plus est, pour effectuer la RT-qPCR, nous avons utilisé une extraction d'ARNs obtenue à partir de cellules baignant dans leur milieu extracellulaire. Il aurait été intéressant de regarder la variabilité de microARNs dans le milieu extracellulaire seulement. Néanmoins, nous n'avons pas été capable de récolter assez d'ARNs extracellulaires pour permettre une quantification de let-7.

De plus en plus de publications amènent un lien entre microARNs et SLA. Jusqu'à maintenant, la plupart des articles et revues parlaient du contrôle de la voie intracellulaire des TLRs par les microARNs, comme c'est le cas des microARNs miR-146a, miR-155 et miR-21 [316,407]. Comme nous l'avons vu, il serait possible que des microARNs, tel que let-7, puissent se lier directement à des TLRs et les activer. Avant d'investiguer cette probabilité, nous avons voulu savoir si l'activation de la voie immunitaire innée TIR-1 nécessitait un récepteur ou non. Ne s'agirait-il pas d'endocytose du signal de danger ? Nous avons utilisé un mutant pour le gène *rme-8* (Receptor mediated endocytosis -8), codant pour une protéine exprimée dans l'hypoderme, l'intestin et les coelomocytes, nécessaire à l'endocytose. Nous avons croisé ce mutant avec TDP-43<sup>A315T</sup>; *nlp-29p::GFP* et n'avons pas observé de différence avec ou sans mutation dans *rme-8*, suggérant que l'endocytose intestinale/hypodermique et l'activation de la voie TIR-1 sont indépendants (Manuscrit 2, Figure 3c).

La relation directe entre let-7 et TOL-1 n'a malheureusement pu être montrée parce que cela aurait nécessité de faire une immunoprécipitation grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-TOL-1, puis la vérification de la présence de let-7. Or, chez *C. elegans*, très peu d'anticorps sont disponibles sur le marché. Ce défaut technique nous a mené à nous tourner vers des prédictions biostatistiques basées sur des algorithmes qui calculent la probabilité qu'une protéine, dont on précise la séquence, puisse se lier à un ARN donné. Grâce à cette interface RPISeq (<http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPISeq/>), nous avons trouvé qu'à *priori* TOL-1 lierait let-7 avec une probabilité de plus de 90% (Manuscrit 2, Figure 6). Pour un récepteur comme DCAR-1, la probabilité était moindre, c'est-à-dire entre 60 et 80%, ce que nos résultats ont confirmé (Manuscrit 1, Figure Supplémentaire 9). Une autre interface (RNABindRPlus, <http://ailab1.ist.psu.edu/RNABindRPlus/>) nous a permis de savoir à quels sites sur la séquence en acides-aminés de TOL-1 pourraient se fixer un ARN [408]. Nous avons pu constater que la plupart des sites étaient présents du côté C-terminal de la protéine, dans la région TIR, conservée à travers les espèces. Il serait donc probable que let-7 lie directement le récepteur TOL-1 chez *C. elegans*, comme il a été montré entre let-7b et TLR-7 sur des lignées cellulaires [308].

Que ce soit par liaison directe ou par répression transcriptionnelle, il est intéressant de noter que d'une manière générale les microARNs qui, selon plusieurs études, ont une tendance à être diminués, tels que miR-143 et miR-149, semblent avoir un rôle inhibiteur de la voie des TLRs (Annexe 2) [409-411]. *A contrario*, la quantité de miR-29 par exemple, selon plusieurs études, semble être plus importante dans les cas de SLA (ou dans les modèles) et ce microARN serait un activateur des TLRs (Annexe 2) [310]. Ces éléments suggèrent que d'une manière ou d'une autre la voie des TLRs serait sur-activée dans les cas de SLA, et potentiellement néfaste pour l'organisme. Le cas de let-7b est particulier puisque plusieurs études ont montré une diminution globale de ce microARN alors que nous n'avons pas observé de différence dans les cellules lymphoblastoïdes de patients ayant la SLA (Annexe 2 et Annexe 4c). Le Dr. Lehmann et ses collaborateurs ont observé en 2012 une augmentation de let-7b chez les patients ayant la maladie d'Alzheimer, corrélant avec le fait que let-7 lie directement le TLR7, ce qui entraîne une neurodégénérescence [308]. Une autre étude très récente a montré qu'une augmentation de let-7b avait lieu chez des poulets

ayant une perte de masse musculaire squelettique importante, liant le développement musculaire, la voie des MAPKs et let-7b [412]. Nous pourrions donc nous attendre à voir une augmentation de ce microARN dans la neurodégénérescence liée à la SLA. D'un autre côté, let-7b semble agir par rétro-contrôle négatif sur la voie intracellulaire des TLRs [413], donc une diminution globale de ce microARN pourrait quand même avoir un effet activateur sur la voie des TLRs. Il se peut finalement, comme le suggèrent les études de Zhou en 2013 et Benigni en 2016, que le brin de let-7b que nous étudions (let-7b-3P ou let-7b-5P) et qui n'est pas clairement explicite la plupart du temps, soit d'importance et que les mécanismes mis en jeu sont différents selon les cas [346,362]. Des analyses approfondies à ce sujet sont donc nécessaires.

Dans ces recherches, nous avons mis l'accent sur les microARNs. Cependant, il est possible que d'autres ARNs soient impliqués dans le phénomène de toxicité. Plus encore si l'on considère le signal reconnu par les TLRs simplement comme des motifs ribonucléiques. Il existe différents types d'ARNs non codants (ARNnc) (Pour revue : [414]) :

✓ **Les ARNnc courts**, parmi lesquels se trouvent les microARNs, les ARN Piwi (ARNpi) et les ARNti (tRNA-derived stress-induced RNA). Les ARNpi ont entre 26 et 31 nucléotides et leurs rôles seraient la répression de transposons dans la lignée germinale, la régulation épigénétique et potentiellement la répression traductionnelle. Ils ont un groupement 2'-O-méthyl en 3' reconnaissable par les protéines Piwi. Les ARNti, quant à eux, font entre 17 et 18 nucléotides et sont associés aux débuts des sites de transcription et sont induits par le stress.

✓ **Les ARNnc moyens**, qui comprennent les ARNsno (small nucleolar ARN), les ARNs associés aux promoteurs (PASRs, promoter-associated small RNAs), les ARNs associés aux débuts des sites de transcription (TSSa-RNAs, Transcription start site associated RNAs) et enfin les PROMPTs (Promoter upstream transcripts). Les ARNsno forment un complexe de protéines et d'ARNsno. Ils sembleraient être impliqués dans l'épissage alternatif d'ARNm, la méthylation et la pseudouridylation des ARNs ribosomiaux. Les PASRs et les TSSa-RNAs font entre 20 et 200 nucléotides et ont une fonction inconnue. Enfin, les PROMPTs sont une

nouvelle classe d'ARNs découverte chez l'Homme, de moins de 200 nucléotides, qui serait associée à l'activation de la transcription de gènes.

✓ **Les ARNnc longs**, qui regroupent les ARNlinc (lincRNA, large intergenic non-coding RNA), les T-UCRs (Transcribed ultraconserved non-coding RNAs) et les autres ARNs longs non-codants (lncRNA). Les ARNlinc font plus de 200 paires de bases, ils ont des rôles variés dont, par exemple, le bon repliement des complexes ADN-chromatine. Les T-UCRs, de plus de 200 nucléotides, réguleraient le niveau d'ARNm et de microARNs. Finalement, les autres lncRNA, de plus de 200 paires de bases, régulent, entre autres, les télomères.

Tous ces ARNs non-codants aux fonctions diverses ont été liés à des pathologies comme le cancer, la maladie d'Alzheimer, le syndrome de Prader-Willi et même la SLA [414].

En dehors du rôle par exemple de TDP-43, FUS, TAF15 et EWSR1 (Ewing sarcoma RNA-binding protein -1) dans les processus de biosynthèse des microARNs, ils ont aussi été montrés pour lier des ARNs non-codants et en particulier les ARNs longs non-codants [35,49,50] (Pour revue : [415]). Plusieurs hypothèses quant à l'évidence que des protéines telles que TDP-43 ou FUS lient des ARNs longs non-codants ont vu le jour : 1) les complexes ainsi formés prennent place dans les inclusions cytoplasmiques, 2) ou même seraient la cause des inclusions cytoplasmiques, 3) l'absence de TDP-43 ou FUS du noyau empêcherait la transcription et la régulation post-transcriptionnelle des ARNs longs non-codants, 4) l'absence de TDP-43 ou FUS affecterait la fonction des ARNs longs non-codants [415]. Il semblerait que toutes ces hypothèses soient vraies. Notamment, le Dr. Tollervy en 2011 a montré un changement d'expression des ARNs longs non-codants dans le cerveau de souris en absence de TDP-43 ou FUS mais également dans les tissus en *post-mortem* de patients ayant eut la SLA [35]. Au delà, ces protéines sembleraient aussi impliquées dans l'aspect fonctionnel des ARNnc [415]. De même qu'une expansion dans le gène *C9orf72* comme il a été montré dans des formes de SLA affecterait le métabolisme des ARNs et potentiellement des ARNs longs non-codants par la séquestration de protéines liant les ARNs dans les foci GGGGCC [415].

Une étude réalisée en 2014 par Saldi et ses collaborateurs a montré que TDP-1, l'orthologue de TDP-43 chez *C. elegans*, module la structure et la stabilité des ARNs double-brins par liaison directe [416]. *A priori*, la fonction de limitation de l'accumulation des ARNs double-brins serait conservée chez la protéine TDP-43 humaine. Nous avons vu dans l'introduction qu'une réduction de l'activité de la protéine ADAR2 chez les patients ayant la SLA avait été observée [332]. Nous pouvons ainsi spéculer en conséquence une accumulation d'ARNs double-brins dans le noyau. Cette dérégulation quantitative laisse présager des conséquences toxiques pour les cellules.

En outre, des ARNnc ont été associés à la régulation de gènes immunitaires, et même à la voie de signalisation des TLRs [417,418]. Il est avancé que les interactions entre les protéines liant les ARNs et les ARNs longs non-codants sont des régulateurs cruciaux des fonctions cellulaires dans un contexte immunitaire [419]. Rappelons le, certains TLRs fixent des ARNs simple-brins, double-brins, ou des motifs nucléotidiques, du soi ou du non-soi. Ainsi les microARNs jouent un rôle important dans la pathologie y compris *à priori* dans sa propagation, mais le postulat pourrait s'étendre aux ARNs non-codants en général.

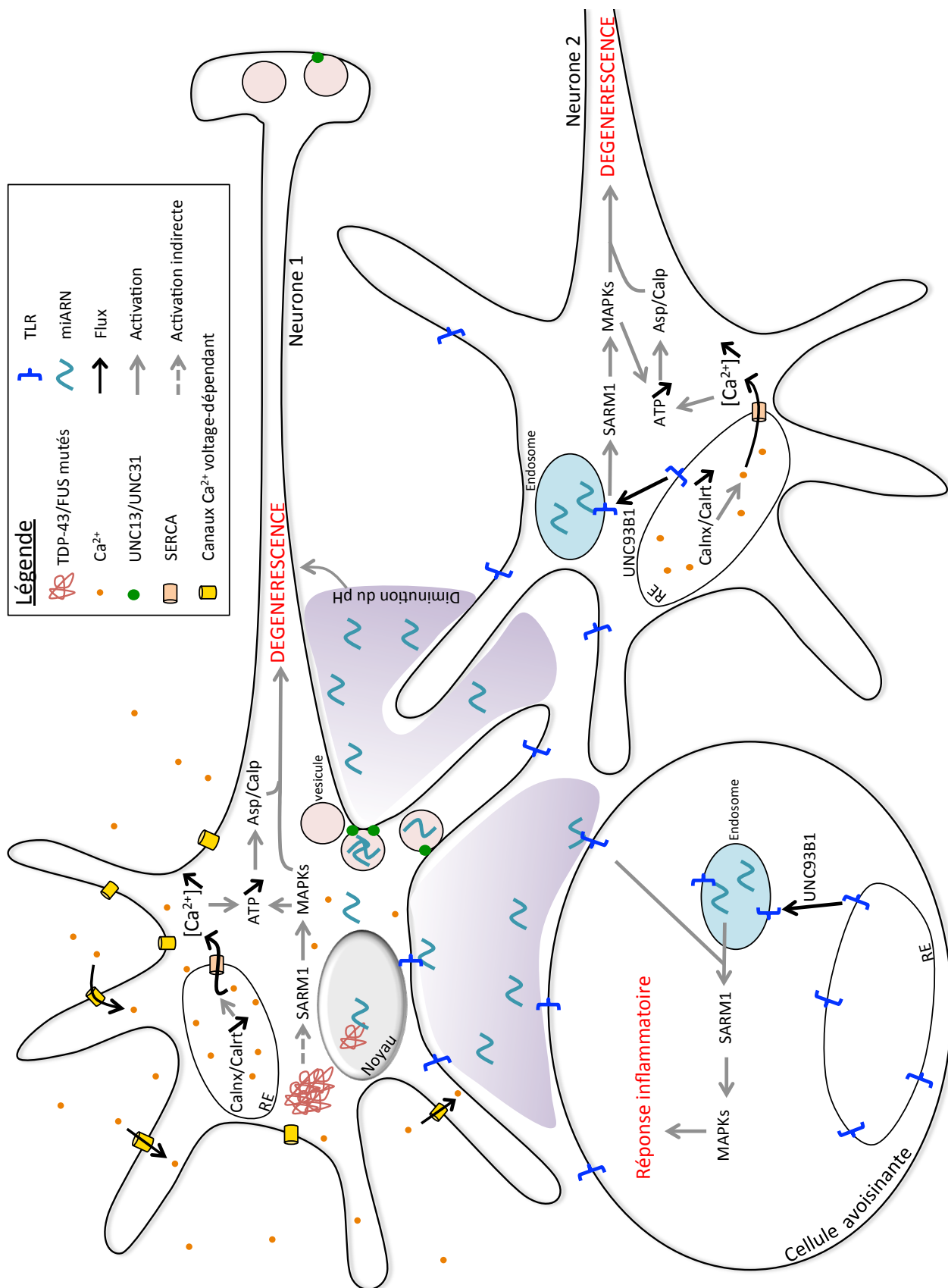
### **III. 3. LES RÉACTIONS INTRACELLULAIRES EN RÉPONSE A UN SIGNAL DE DANGER**

La dégénérescence par « sarmoptose » commencerait, d'après nos résultats, d'abord par une activation autocrine de la voie immunitaire TIR-1 puis toucherait les neurones adjacents (comme les neurones cholinergiques, Manuscrit 2, Figure 1) ainsi que les autres tissus (comme l'hypoderme et l'intestin, Manuscrit 1, Figure 1).

Les protéines causatives comme TDP-43 ou FUS entraîneraient l'activation de la voie Sarm1/TIR-1 et les MAPKs en aval menant à la dégénérescence [373] (Manuscrit 1). L'hypothèse se tient puisque *Sarm1* chez l'homme est présent dans le foie et les reins [420], mais surtout dans le cerveau au niveau des neurones [421]. Chez *C. elegans*, l'orthologue de Sarm1, TIR-1, est hautement exprimé dans l'hypoderme, l'intestin et certains neurones au niveau synaptique entre autres.

De plus, les MAPKs entraînent également un déficit de synthèse de l'ATP [209], ce qui peut causer une activation de calpaïnes et d'aspartyl qui mène à une nécrose [144] (Figure 19 et Annexe 1). Il a également été montré que chez des souris SOD1<sup>G93A</sup>, modèle murin de SLA, des canaux calcium-voltage dépendant étaient présents en plus grande quantité au niveau neuronal [146]. Cela aurait pour conséquence un flux plus important de calcium dans la cellule, une diminution de la synthèse d'ATP, une activation des protéines calpaïnes et aspartyl et enfin une nécrose neuronale (Figure 19). L'augmentation de calcium intracytoplasmique serait renforcée par la diminution de calréticuline et de calnexine au sein du RE, observée chez les patients ayant la SLA [144,422]. Enfin, des protéines impliquées dans la SLA telles que TDP-43 modulent la biogénèse des microARNs, notamment à destination extracellulaire [38,336,423] (Manuscrit 2 et Figure 19). Une variabilité allélique dépendante des patients au niveau de la protéine UNC-13A [252,253] modifierait la relâche de ces molécules. De plus, la protéine UNC-31, qui code pour une protéine dépendante du calcium qui permet la fusion de microvésicules à la membrane modulerait également l'exocytose de microvésicules et leur contenant [401].

Une fois dans le milieu extracellulaire, les microARNs – contenus dans des microvésicules ou non – seraient captés par les cellules avoisinantes, neuronales ou non. Il a été montré que la protéine UNC93B1 régule le transport des TLRs sensibles aux acides-nucléïques du réticulum endoplasmique (RE) vers les endosomes [424-428]. L'activation de ces récepteurs entraînerait une variabilité calcique et, *in fine*, une diminution de la synthèse d'ATP. De là, retour au schéma précédent : activation de calpaïnes et d'aspartyl menant à une nécrose, ou dans le cas de cellules immunitaires, telles que les cellules intestinales/hypodermiques chez *C. elegans* ou des microglies par exemple chez les mammifères, une réponse inflammatoire (Figure 19). L'activation de ces récepteurs – et par conséquent l'activation de la voie Sarm1/TIR-1 dans les neurones adjacents – pourrait résulter d'une liaison avec des microARNs relâchés dans le milieu extracellulaire, comme cela semblerait être le cas pour let-7 (Manuscrit 2). Enfin, il est à noter qu'une diminution très locale du pH due aux microARNs pourrait accentuer le phénomène de dégénérescence des neurones, très sensibles aux variations de pH (Figure 19).





**Figure 19 : Schéma bilan des processus entrant dans la dégénérescence neuronale dans la SLA.** TDP-43/FUS mutés entraînent l'activation de Sarm1, puis des MAPKs en aval et ainsi diminuent l'ATP. Cela agirait sur l'aspartyl et la calpaïne menant à la neurodégénérescence. La diminution de la calnexine et de la calréticuline du RE entraînent une sortie de calcium dans le cytoplasme *via* des pompes SERCA, agissant également sur l'ATP. Calcium étant par ailleurs importé du milieu extracellulaire par des canaux calciques voltage-dépendants. Les miRNAs relâchés dans le milieu extracellulaire peuvent éventuellement faire varier le pH et influencés la survie cellulaire. Les miRNAs ainsi relâchés pourraient se fixer aux TLRs de cellules avoisinantes, activant la voie Sarm1, se traduisant par une réponse inflammatoire ou par une dégénérescence dans le cas d'un autre neurone. Le recrutement de UNC93B1 du RE vers les endosomes pourrait favoriser la liaison aux miRNAs et induire une réponse Sarm1. Abréviations : Asp, Aspartyl ; ATP, Adénosine triphosphate ; Calnx, Calnexine ; Calp, Calpaïne ; Calrt, Calréticuline ; FUS, Fused in sarcoma ; MAPKs, Mitogen-activated protein kinases ; RE, Réticulum endoplasmique ; SAarm, Sterile  $\alpha$  and TIR motif containing 1 ; SERCA, sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ; TDP-43, TAR-DNA binding protein -43 ; TLR, Toll-like receptor.

---

### III. 4. LES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES POTENTIELLES

A l'heure actuelle, le seul traitement contre la SLA est le riluzole qui, jouant sur la libération de glutamate, prolonge la vie de 2 à 3 mois. Il n'a pas d'effet secondaire notable et est bien assimilé néanmoins très couteux, le rapport coût-bénéfice reste très mitigé.

Il est intéressant de regarder les études cliniques de ces 10 dernières années portant sur la SLA (Annexe 5) (<https://clinicaltrials.gov>). Beaucoup d'études sont en cours un peu partout à travers le monde, par conséquent les résultats ne sont pas encore connus. Nous observons néanmoins que plusieurs d'entre elles se penchent sur la modulation du système immunitaire.

#### La modulation de la voie immunitaire innée par inhibition de la MAPK p38:

Effectivement, nous l'avons vu dans l'introduction, le système immunitaire est dérégulé dans la SLA. Il est difficile à dire s'il s'agit d'une cause – ce qui serait probable parce que l'activation immunitaire survient très tôt dans la maladie - ou d'une conséquence, comme celle de dommages neuronaux par exemple, d'une réaction abérrante à un signal ou

à une mauvaise signalisation. Nous avons utilisé dans le premier manuscrit un inhibiteur pharmacologique de la protéine p38, qui a réduit drastiquement la paralysie et la neurodégénérescence induites par TDP-43<sup>A315T</sup> chez les vers *C. elegans* (Manuscrit 1, Figure 4). L'utilisation d'inhibiteurs de la protéine MAPK p38 fait déjà l'objet de plus d'une vingtaine d'études cliniques dans tous les domaines possibles (cancers, ostéoarthrites, cardiomyopathies, douleurs, asthme, maladies vasculaires, maladie d'Alzheimer et surtout en ce qui concerne les arthrites rhumatoïdes) (<https://clinicaltrials.gov>). Les perspectives quant à l'utilisation d'une telle molécule sont encourageantes, mais il faudrait faire plus de tests, notamment toxicologiques, et sur divers modèles animaux avant un éventuel passage en clinique. Néanmoins, si des inhibiteurs de p38 arrivent sur le marché pour d'autres maladies, cela sera plus simple pour l'investigation sur la SLA.

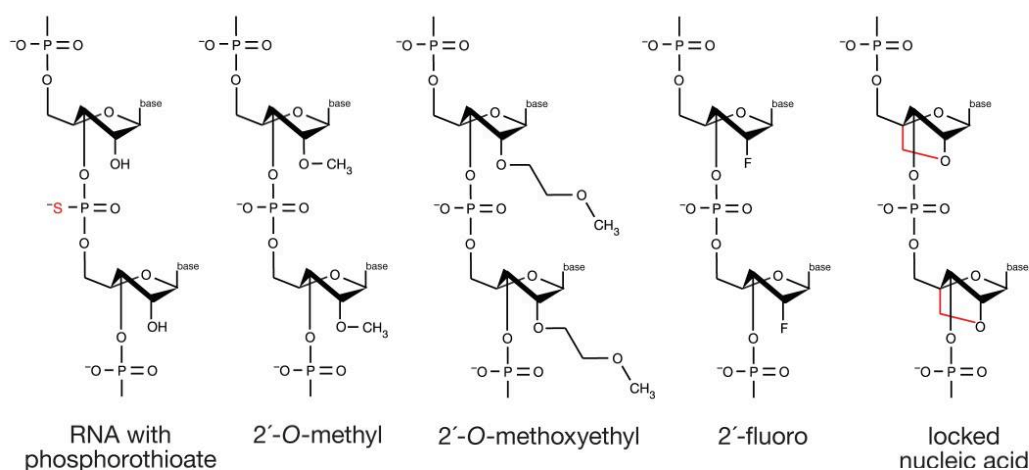
### Le ciblage des microARNs

Il y a plusieurs possibilités d'utilisation des microARNs comme approches thérapeutiques potentielles de la SLA. À commencer par le biomarquage. En effet, un des défis principaux de la SLA est de pouvoir la diagnostiquer précocement. À l'heure actuelle, lors du diagnostic, il est trop tard car la dégénérescence et la myotrophie sont déjà très avancées. Une des études cliniques sur la SLA porte sur des microARNs biomarqueurs que l'on pourrait trouver dans le sang, le liquide céphalorachidien et les biopsies musculaires de patients. Nous avons vu dans l'introduction plusieurs articles mentionnant des dérégulations globales de microARNs, quelques-uns même ressortent à travers plusieurs études avec une même tendance. Par exemple il semblerait que les microARNs let-7b, miR-132-5P, miR-328 et miR-638 diminuent dans les cas pathologiques de SLA et les microARNs miR-29, miR-206 et miR-338-5P augmentent (Tableau 1). Sachant qu'un bon biomarqueur doit être suffisamment abondant dans les tissus, éventuellement les microARNs en plus forte quantité pourraient devenir de bons biomarqueurs, mais des études complémentaires sont nécessaires.

En dehors de l'étude des microARNs en tant que biomarqueurs, il serait possible de les utiliser de manière différente. Dans une très intéressante revue, le Dr. Esteller envisage des thérapies visant à rétablir un déficit ou un excès en microARNs [414]. Un déficit pourrait se combler par 1) l'utilisation de virus délivrant des microARNs, 2) par médication

épigénétique afin de réactiver la transcription de leur gène, par exemple *via* des agents inhibiteurs de la déméthylation de l'ADN et des histones déacétylases ou encore 3) grâce à l'enoxacine qui augmente la production de TARBP2, un membre du complexe Dicer afin d'augmenter le processus de biogénèse des microARNs. Néanmoins dans ce dernier cas de figure c'est l'ensemble des microARNs qui serait sur-exprimé, et potentiellement des microARNs « néfastes ». Par exemple une injection intratumorale de let-7 exogène permettrait de bloquer le développement d'une tumeur dans un modèle murin de cancer du poumon [429],[430]. *A contrario*, pour diminuer un excès de microARNs menant à une pathologie, il serait possible 1) d'avoir recours à des antagonistes synthétiques de microARNs ou 2) d'utiliser des vecteurs contenant des sites artificiels multiples et spécifiques afin de neutraliser les microARNs « encombrants » [414].

Il existe différents oligonucléotides antisens ayant un rôle inhibiteur spécifique de microARNs. Par exemple, l'ajout de groupements spécifiques, comme les groupements phosphothioate, 2'-O-methyl, 2'-O-methoxyethyl, 2'-fluoro et des ponts méthylènes chez les acides nucléiques bloqués (LNA, locked nucleic acid) permet une action inhibitrice de microARNs spécifiques (Figure 20). Les premières expériences voulant inhiber des microARNs ont eut recours à des antagomiRs avec groupements 2'-O-methyl sur le ribose et ont été délivrés grâce à des gouttelettes lipidiques [431] *in vivo*. Le problème majeur serait la haute dose nécessaire à avoir un effet significatif (Pour revue : [432]). Les autres groupements ont plus d'affinité avec leur microARN spécifique et ont un potentiel thérapeutique plus grand.



**Figure 20 : Modifications chimiques d'oligonucléotides antisens.**

Plus concrètement, les microARNs sont au cœur de nombreuses études cliniques (Annexe 6), plus de 90% d'entre elles cherchent en eux des biomarqueurs, cependant, certaines études tentent une approche différente :

- Certaines études quantifient des microARNs spécifiques ou même les protéines impliquées dans la biogénèse des microARNs (Annexe 6).

- Une étude essaye l'injection d'un ensemble de 6 microARNs différents en adjuvant au riluzole, sensés aider à son action. Cette étude est réalisée dans le cadre du cancer colorectal (Annexe 6).

- L'utilisation d'antagomiRs tel que l'antagomiR-122, SPC3649 (autrement appelé miravirsén) est également en essai clinique. C'est une séquence possédant des acides-aminés bloqués (Locked nucleic acid, LNA) à cause d'un pont méthylène (Figure 20) [433]. Ainsi cet antagomiR sert d'antagoniste au microARN miR-122, mis en cause dans l'hépatite C (Annexe 6). Au préalable à une étude chez l'homme, cet inhibiteur avait été utilisé chez des chimpanzés ayant l'hépatite C, à 5 mg/kg pour 12 semaines en intraveineuse. La virémie avait été supprimée, l'histologie du foie améliorée et aucune toxicité n'avait été révélée [434].

- Une étude portant sur le cancer hépatique implique un mimétique de miR-34. Sa structure est un ARN double brin, appelé MRX34, devant neutraliser miR-34 (Annexe 6).

- Enfin, une dernière étude porte sur des TargomiRs dans le cancer du poumon. Il s'agit là de délivrer en intraventriculaire des « nanocellules » contenant un mimétique de miR-16 (nommé mésomiR), montré impliqué dans ce type de cancer (Annexe 6).

De manière assez curieuse, aucun résultat n'est donné quant aux microARNs sur le site des essais cliniques. Il est vrai néanmoins que la plupart sont en cours tant ce champ d'investigation est récent. Nous devons attendre quelques années avant de voir les possibilités que les microARNs offrent mais il y a bon espoir que, pour la SLA, de nouvelles approches soient envisagées. Il faut néanmoins rester prudent avec ces outils que nous connaissons finalement assez mal. Des études toxicologiques sur le long terme sont nécessaires. C'est ainsi qu'il a été noté qu'une surexpression d'ARNs en épingle à cheveux chez le rat causait une toxicité hépatique grave, des lésions de plusieurs organes et *in fine* la mort de l'animal [435]. De plus, souvent les inhibiteurs de microARNs enclins à la dégradation par des ARNases, peuvent *a priori* avoir une plus faible perméabilité membranaire et le système immunitaire peut aller à l'encontre de leur efficacité [436].

#### **IV. Conclusion et perspectives**

Tout au long de cette étude, nous avons voulu parcourir de nouveaux axes de recherches au sujet de cette maladie handicapante et toujours incurable qu'est la sclérose latérale amyotrophique. Séparer le système nerveux et le reste d'un organisme est une erreur que beaucoup d'études commettent. Grâce à un outil simple et rapide, *C. elegans*, nous avons investigué l'implication du système immunitaire innée dans deux modèles de SLA, TDP-43 et FUS. Il ressort de ce travail que la voie Sarm1/TIR-1 est activée dans le système nerveux et dans des cellules avoisinantes, rappelant ainsi que la propagation trans-cellulaire est un paramètre crucial dans la SLA. Si nous ne sommes pas à même de comprendre les origines de cette pathologie, nous pouvons à défaut tenter de comprendre les mécanismes de diffusion afin de stopper sa progression. Alors que nous aurions pu avoir une approche

protéique « classique », nous nous sommes tournés vers le RNAome. Partant d'évidences que des microARNs étaient dérégulés dans la SLA et qu'ils pouvaient être perçus comme des séquences mobiles d'acides nucléïques, s'apparentant à des signaux de danger comme le sont certains ARNs viraux par exemple, et pouvant lier des récepteurs et en activer les voies, nous nous sommes intéressés à eux. Et plus particulièrement au microARN let-7, qui à travers nos résultats s'est avéré être un acteur principal de la dégénérescence induite par TDP-43<sup>A315T</sup>, mais aussi un acteur de la propagation trans-cellulaire.

L'ensemble de nos idées, observations et analyses sont pionnières dans le domaine et ouvrent le champ des perspectives. Bien que ces résultats soient extrêmement excitants et encourageants pour la suite, il est de mise d'être prudent. D'autant plus que nos résultats s'appuient sur des modèles TDP-43 et FUS chez le nématode alors que ce n'est qu'une petite partie des patients qui ont une mutation dans les gènes codant ces protéines. Des études plus approfondies basées sur d'autres modèles, voire directement chez l'Homme sont nécessaires pour valider nos observations.

Bien des questions restent en suspens : Quel dérèglement est à l'origine d'une mort des motoneurones ? Pourquoi les autres neurones/cellules semblent moins affectées ? Pourquoi cela survient-il aux abords de la soixantaine et pas avant puisque l'ensemble des molécules investiguées jusqu'aujourd'hui sont présentes bien avant ? Quel est le mécanisme commun à toutes les formes différentes de SLA ? Est ce que les récepteurs TLRs sont impliqués dans la propagation trans-cellulaire ? Comment manipuler la balance immunitaire, qui reste indispensable mais doit être hautement contrôlée ? Jusqu'où peut nous mener l'investigation des microARNs dans cette pathologie ? Est-il possible qu'un microARN spécifique tel que let-7 soit à l'origine d'un tel dérèglement menant à la mort neuronale ? Pourraient-ils devenir des outils thérapeutiques fiables et puissants ? Autant de questions qui nécessitent des idées nouvelles, des modèles différents, des techniques diverses et variées et un redoublement d'efforts afin que la SLA devienne curable dans les années à venir.

Concernant des perspectives plus immédiates, plusieurs expérimentations sont souhaitables. Premièrement, il faudrait vérifier que let-7 est bien un messager trans-cellulaire liant TOL-1 chez le ver. L'ensemble de nos analyses convergent vers cette conclusion, analyses algorithmiques à l'appui, mais la preuve d'une liaison directe n'a pas

été démontrée. Cela pourra être fait par immunoprécipitation du récepteur TOL-1 et vérification de la présence de let-7. Il faudra au préalable se munir d'un anticorps reconnaissant TOL-1 chez *C. elegans*. Secondairement, nous avons évoqué la possibilité d'une variation de pH à l'origine d'une dégénérescence sélective des neurones. Chez *C. elegans*, le gène *clh-1* code pour deux canaux chlorure de type CLC, homologue à CLC1 et CLC2 chez l'homme. Ces canaux sont essentiels au maintien de la composition ionique et du pH, principalement au niveau synaptique, et cela grâce aux cellules gliales du nématode. Le pH est régulé par tamponnage de l'ion  $\text{HCO}_3^-$ , en plus de la régulation du flux de l'ion  $\text{Cl}^-$  synaptique. Ainsi, le croisement de cette souche mutante avec nos modèles de SLA TDP-43 et FUS et des tests de paralysie, de neurodégénérescence et de quantification de microARNs pourraient nous en apprendre plus sur l'hypothétique présence d'une variation de pH dans nos modèles. Cette découverte serait d'une importance capitale, encore une fois dans la compréhension des mécanismes de neurodégénérescence observée dans la SLA et dans l'élaboration d'un traitement. Toisièmement, il serait possible d'utiliser un modèle murin de SLA afin de valider nos résultats obtenus chez le ver. Pour cela, il est à notre disposition une souche de souris TDP-43<sup>Q331K</sup>, où la protéine humaine est exprimée partout dans le système nerveux et développant un phénotype moteur lié à l'âge, ainsi qu'une perte motoneuronale et une dégénérescence axonale. Il serait possible de faire des cultures primaires de cellules neuronales afin de quantifier aisément les microARNs, dont let-7 afin de valider nos résultats. Enfin, une autre souche de souris est actuellement notre disposition, il s'agit de souris « knock-out » pour le gène *sarm-1*. Pour nous permettre de vérifier que la voie Sarm1 est impliquée dans la mort neuronale et les conséquences qui s'en suivent, il serait souhaitable de croiser cette souche avec les souris TDP-43<sup>Q331K</sup>, puis de faire par exemple des immunohistochimies sur des coupes fixées de moelle-épine et de cerveau et de localiser TDP-43, ainsi que les jonctions neuromusculaires pour voir une éventuelle dénervation. Il serait possible de faire un Western-Blot également, pour voir si, comme nos résultats le suggèrent, la mutation de *sarm-1* n'affecte pas la quantité de TDP-43. Evidemment, une RT-qPCR afin de quantifier let-7 serait réalisée. Pour finir, des tests comportementaux sur les souris (Grip et Rotarod) afin d'évaluer si la perte de Sarm1 restaure bien un phénotype sauvage aux souris TDP-43<sup>Q331K</sup> pourraient être entrepris.

## V. Bibliographie

1. Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, et al. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*. Karger Publishers; 2013;41: 118–130. doi:10.1159/000351153
2. Iwanaga K, Hayashi S, Oyake M, Horikawa Y, Hayashi T, Wakabayashi M, et al. Neuropathology of sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration. *J Neurol Sci*. 1997;146: 139–143.
3. Swinnen B, Robberecht W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2014;10: 661–670. doi:10.1038/nrneurol.2014.184
4. Pupillo E, Messina P, Logroscino G, Beghi E, SLALOM Group. Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Ann Neurol*. 2014;75: 287–297. doi:10.1002/ana.24096
5. Yu Y, Su F-C, Callaghan BC, Goutman SA, Batterman SA, Feldman EL. Environmental risk factors and amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a case-control study of ALS in Michigan. Borchelt DR, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2014;9: e101186. doi:10.1371/journal.pone.0101186
6. Weisskopf MG, Morozova N, O'Reilly EJ, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, et al. Prospective study of chemical exposures and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. BMJ Publishing Group Ltd; 2009;80: 558–561. doi:10.1136/jnnp.2008.156976
7. Bozzoni V, Pansarasa O, Diamanti L, Nosari G, Cereda C, Ceroni M. Amyotrophic lateral sclerosis and environmental factors. *Funct Neurol*. 2016;31: 7–19.
8. Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano PF, et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int*. 2015;6: 171. doi:10.4103/2152-7806.169561
9. Chen H, Richard M, Sandler DP, Umbach DM, Kamel F. Head injury and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol*. Oxford University Press; 2007;166: 810–816. doi:10.1093/aje/kwm153
10. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. Nature Publishing Group; 1993;362: 59–62. doi:10.1038/362059a0
11. Bowling AC, Schulz JB, Brown RH, Beal MF. Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic



amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 1993;61: 2322–2325.

12. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science.* 1994;264: 1772–1775.
13. Oeda T, Shimohama S, Kitagawa N, Kohno R, Imura T, Shibasaki H, et al. Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Human Molecular Genetics.* 2001;10: 2013–2023.
14. Lemmens R, Van Hoecke A, Hersmus N, Geelen V, D'Hollander I, Thijs V, et al. Overexpression of mutant superoxide dismutase 1 causes a motor axonopathy in the zebrafish. *Human Molecular Genetics.* Oxford University Press; 2007;16: 2359–2365. doi:10.1093/hmg/ddm193
15. Watson MR, Lagow RD, Xu K, Zhang B, Bonini NM. A drosophila model for amyotrophic lateral sclerosis reveals motor neuron damage by human SOD1. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology;* 2008;283: 24972–24981. doi:10.1074/jbc.M804817200
16. Chieppa MN, Perota A, Corona C, Grindatto A, Lagutina I, Vallino Costassa E, et al. Modeling amyotrophic lateral sclerosis in hSOD1 transgenic swine. *Neurodegener Dis.* 2014;13: 246–254. doi:10.1159/000353472
17. Irvin CW, Kim RB, Mitchell CS. Seeking homeostasis: temporal trends in respiration, oxidation, and calcium in SOD1 G93A Amyotrophic Lateral Sclerosis mice. *Front Cell Neurosci. Frontiers;* 2015;9: 248. doi:10.3389/fncel.2015.00248
18. Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene.* 2016;577: 109–118. doi:10.1016/j.gene.2015.11.049
19. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company;* 1995;38: 73–84. doi:10.1002/ana.410380114
20. Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, et al. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences. National Acad Sciences;* 2002;99: 1604–1609. doi:10.1073/pnas.032539299
21. Kikuchi H, Almer G, Yamashita S, Guégan C, Nagai M, Xu Z, et al. Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences. National Acad Sciences; 2006;103: 6025–6030.  
doi:10.1073/pnas.0509227103

22. Kabashi E, Agar JN, Taylor DM, Minotti S, Durham HD. Focal dysfunction of the proteasome: a pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. Blackwell Science Ltd; 2004;89: 1325–1335. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02453.x
23. Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien J-P. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. Nature Publishing Group; 2006;9: 108–118. doi:10.1038/nn1603
24. Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci*. 1999;2: 50–56. doi:10.1038/4553
25. Murakami T, Nagano I, Hayashi T, Manabe Y, Shoji M, Setoguchi Y, et al. Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated E. coli LacZ gene in the mice carrying mutant SOD1 gene. *Neurosci Lett*. 2001;308: 149–152.
26. Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci*. 2006;9: 408–419. doi:10.1038/nn1653
27. Henkel JS, Beers DR, Wen S, Bowser R, Appel SH. Decreased mRNA expression of tight junction proteins in lumbar spinal cords of patients with ALS. *Neurology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2009;72: 1614–1616. doi:10.1212/WNL.0b013e3181a41228
28. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol*. Rockefeller Univ Press; 2009;187: 761–772. doi:10.1083/jcb.200908164
29. Ou SH, Wu F, Harrich D, García-Martínez LF, Gaynor RB. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol*. 1995;69: 3584–3596.
30. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2006;314: 130–133. doi:10.1126/science.1134108
31. Bodansky A, Kim JMH, Tempest L, Velagapudi A, Libby R, Ravits J. TDP-43 and ubiquitinated cytoplasmic aggregates in sporadic ALS are low frequency and widely distributed in the lower motor neuron columns independent of disease spread.

Amyotroph Lateral Scler. Taylor & Francis; 2010;11: 321–327.  
doi:10.3109/17482961003602363

32. Liu R, Yang G, Nonaka T, Arai T, Jia W, Cynader MS. Reducing TDP-43 aggregation does not prevent its cytotoxicity. *Acta Neuropathol Commun. BioMed Central*; 2013;1: 49. doi:10.1186/2051-5960-1-49
33. Casafont I, Bengoechea R, Tapia O, Berciano MT, Lafarga M. TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons. *J Struct Biol.* 2009;167: 235–241. doi:10.1016/j.jsb.2009.06.006
34. Buratti E, Dörk T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, Baralle FE. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J. EMBO Press*; 2001;20: 1774–1784. doi:10.1093/emboj/20.7.1774
35. Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci.* 2011;14: 452–458. doi:10.1038/nn.2778
36. Mercado PA, Ayala YM, Romano M, Buratti E, Baralle FE. Depletion of TDP 43 overrides the need for exonic and intronic splicing enhancers in the human apoA-II gene. *Nucleic Acids Research. Oxford University Press*; 2005;33: 6000–6010. doi:10.1093/nar/gki897
37. Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP. Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *J Proteome Res. American Chemical Society*; 2010;9: 1104–1120. doi:10.1021/pr901076y
38. Kawahara Y, Mieda-Sato A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci USA. National Acad Sciences*; 2012;109: 3347–3352. doi:10.1073/pnas.1112427109
39. Feiler MS, Strobel B, Freischmidt A, Helferich AM, Kappel J, Brewer BM, et al. TDP-43 is intercellularly transmitted across axon terminals. *J Cell Biol. Rockefeller Univ Press*; 2015;211: 897–911. doi:10.1083/jcb.201504057
40. McDonald KK, Aulas A, Destroismaisons L, Pickles S, Beleac E, Camu W, et al. TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Human Molecular Genetics. Oxford University Press*; 2011;20: 1400–1410. doi:10.1093/hmg/ddr021
41. Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang Y-J, Vanderweyde T, Vanderwyde T, Citro A, et al. Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. Bush AI, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2010;5: e13250. doi:10.1371/journal.pone.0013250

42. Crozat A, Aman P, Mandahl N, Ron D. Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature*. Nature Publishing Group; 1993;363: 640–644. doi:10.1038/363640a0
43. Kwiatkowski TJ, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2009;323: 1205–1208. doi:10.1126/science.1166066
44. Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2009;323: 1208–1211. doi:10.1126/science.1165942
45. Baechtold H, Kuroda M, Sok J, Ron D, Lopez BS, Akhmedov AT. Human 75-kDa DNA-pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation. *J Biol Chem*. 1999;274: 34337–34342.
46. Tan AY, Riley TR, Coady T, Bussemaker HJ, Manley JL. TLS/FUS (translocated in liposarcoma/fused in sarcoma) regulates target gene transcription via single-stranded DNA response elements. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Acad Sciences; 2012;109: 6030–6035. doi:10.1073/pnas.1203028109
47. Takahama K, Oyoshi T. Specific binding of modified RGG domain in TLS/FUS to G-quadruplex RNA: tyrosines in RGG domain recognize 2'-OH of the riboses of loops in G-quadruplex. *J Am Chem Soc*. American Chemical Society; 2013;135: 18016–18019. doi:10.1021/ja4086929
48. Takahama K, Takada A, Tada S, Shimizu M, Sayama K, Kurokawa R, et al. Regulation of telomere length by G-quadruplex telomere DNA- and TERRA-binding protein TLS/FUS. *Chem Biol*. 2013;20: 341–350. doi:10.1016/j.chembiol.2013.02.013
49. Hoell JI, Larsson E, Runge S, Nusbaum JD, Duggimpudi S, Farazi TA, et al. RNA targets of wild-type and mutant FET family proteins. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18: 1428–1431. doi:10.1038/nsmb.2163
50. Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Hutt KR, Vu AQ, Baughn M, Huelga SC, et al. Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat Neurosci*. 2012;15: 1488–1497. doi:10.1038/nn.3230
51. Lerga A, Hallier M, Delva L, Orvain C, Gallais I, Marie J, et al. Identification of an RNA binding specificity for the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2001;276: 6807–6816. doi:10.1074/jbc.M008304200
52. Zinszner H, Sok J, Immanuel D, Yin Y, Ron D. TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling. *J Cell Sci*. 1997;110 ( Pt 15): 1741–1750.

53. Zinszner H, Immanuel D, Yin Y, Liang FX, Ron D. A topogenic role for the oncogenic N-terminus of TLS: nucleolar localization when transcription is inhibited. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 1997;14: 451–461. doi:10.1038/sj.onc.1200854
54. Bentmann E, Haass C, Dormann D. Stress granules in neurodegeneration--lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS J*. 2013;280: 4348–4370. doi:10.1111/febs.12287
55. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *NEURON*. 2011;72: 245–256. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.011
56. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *NEURON*. 2011;72: 257–268. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.010
57. Gómez-Tortosa E, Gallego J, Guerrero-López R, Marcos A, Gil-Neciga E, Sainz MJ, et al. C9ORF72 hexanucleotide expansions of 20-22 repeats are associated with frontotemporal deterioration. *Neurology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2013;80: 366–370. doi:10.1212/WNL.0b013e31827f08ea
58. Byrne S, Heverin M, Elamin M, Walsh C, Hardiman O. Intermediate repeat expansion length in C9orf72 may be pathological in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014;15: 148–150. doi:10.3109/21678421.2013.838586
59. Harms MB, Cady J, Zaidman C, Cooper P, Bali T, Allred P, et al. Lack of C9ORF72 coding mutations supports a gain of function for repeat expansions in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*. Elsevier; 2013;34: 2234.e13–9. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.006
60. Nordin A, Akimoto C, Wuolikainen A, Alstermark H, Jonsson P, Birve A, et al. Extensive size variability of the GGGGCC expansion in C9orf72 in both neuronal and non-neuronal tissues in 18 patients with ALS or FTD. *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press; 2015;24: 3133–3142. doi:10.1093/hmg/ddv064
61. Zhang D, Iyer LM, He F, Aravind L. Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Front Genet*. Frontiers; 2012;3: 283. doi:10.3389/fgene.2012.00283
62. Levine TP, Daniels RD, Gatta AT, Wong LH, Hayes MJ. The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics*. Oxford University Press; 2013;29: 499–503. doi:10.1093/bioinformatics/bts725
63. Farg MA, Sundaramoorthy V, Sultana JM, Yang S, Atkinson RAK, Levina V, et al.

- C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press; 2014;23: 3579–3595. doi:10.1093/hmg/ddu068
64. Freibaum BD, Lu Y, Lopez-Gonzalez R, Kim NC, Almeida S, Lee K-H, et al. GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature*. 2015;525: 129–133. doi:10.1038/nature14974
  65. Zhang K, Donnelly CJ, Haeusler AR, Grima JC, Machamer JB, Steinwald P, et al. The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature*. 2015;525: 56–61. doi:10.1038/nature14973
  66. O'Rourke JG, Bogdanik L, Yáñez A, Lall D, Wolf AJ, Muhammad AKMG, et al. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2016;351: 1324–1329. doi:10.1126/science.aaf1064
  67. Atanasio A, Decman V, White D, Ramos M, Ikiz B, Lee H-C, et al. C9orf72 ablation causes immune dysregulation characterized by leukocyte expansion, autoantibody production, and glomerulonephropathy in mice. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2016;6: 23204. doi:10.1038/srep23204
  68. Aulas A, Vande Velde C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Front Cell Neurosci*. Frontiers; 2015;9: 423. doi:10.3389/fncel.2015.00423
  69. Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, Ennis S, Cashman S, Donaghy C, et al. ANG mutations segregate with familial and “sporadic” amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*. 2006;38: 411–413. doi:10.1038/ng1742
  70. Lee T, Li YR, Ingre C, Weber M, Grehl T, Gredal O, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press; 2011;20: 1697–1700. doi:10.1093/hmg/ddr045
  71. Droppelmann CA, Wang J, Campos-Melo D, Keller B, Volkening K, Hegele RA, et al. Detection of a novel frameshift mutation and regions with homozygosity within ARHGEF28 gene in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2013;14: 444–451. doi:10.3109/21678421.2012.758288
  72. Ma Y, Tang L, Chen L, Zhang B, Deng P, Wang J, et al. ARHGEF28 gene exon 6/intron 6 junction mutations in Chinese amyotrophic lateral sclerosis cohort. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014;15: 309–311. doi:10.3109/21678421.2014.896926
  73. Johnson JO, Pioro EP, Boehringer A, Chia R, Feit H, Renton AE, et al. Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. 2014. doi:10.1038/nn.3688

74. Zhao Z-H, Chen W-Z, Wu Z-Y, Wang N, Zhao G-X, Chen W-J, et al. A novel mutation in the senataxin gene identified in a Chinese patient with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* Taylor & Francis; 2009;10: 118–122. doi:10.1080/17482960802572673
75. Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, et al. ERBB4 mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. *Am J Hum Genet.* Elsevier; 2013;93: 900–905. doi:10.1016/j.ajhg.2013.09.008
76. Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, et al. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nature Genetics.* 2001;29: 166–173. doi:10.1038/ng1001-166
77. Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, Andersen PM, et al. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology.* Lippincott Williams & Wilkins; 2006;67: 1074–1077. doi:10.1212/01.wnl.0000231510.89311.8b
78. Cox LE, Ferraiuolo L, Goodall EF, Heath PR, Higginbottom A, Mortiboys H, et al. Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Cookson MR, editor. *PLoS ONE.* Public Library of Science; 2010;5: e9872. doi:10.1371/journal.pone.0009872
79. Chow CY, Landers JE, Bergren SK, Sapp PC, Grant AE, Jones JM, et al. Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am J Hum Genet.* Elsevier; 2009;84: 85–88. doi:10.1016/j.ajhg.2008.12.010
80. Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 2010;465: 223–226. doi:10.1038/nature08971
81. Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2011;70: 913–919. doi:10.1002/ana.22534
82. Orlacchio A, Babalini C, Borreca A, Patrono C, Massa R, Basaran S, et al. SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* Oxford University Press; 2010;133: 591–598. doi:10.1093/brain/awp325
83. Daoud H, Zhou S, Noreau A, Sabbagh M, Belzil V, Dionne-Laporte A, et al. Exome sequencing reveals SPG11 mutations causing juvenile ALS. *Neurobiology of Aging.* Elsevier; 2012;33: 839.e5–9. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.012
84. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HCA, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* Elsevier;

2004;75: 822–831. doi:10.1086/425287

85. Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *NEURON*. Elsevier; 2010;68: 857–864. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.036
86. González-Pérez P, Cirulli ET, Drory VE, Dabby R, Nisipeanu P, Carasso RL, et al. Novel mutation in VCP gene causes atypical amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2012;79: 2201–2208. doi:10.1212/WNL.0b013e318275963b
87. Münch C, Sedlmeier R, Meyer T, Homberg V, Sperfeld AD, Kurt A, et al. Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology*. 2004;63: 724–726.
88. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998;393: 702–705. doi:10.1038/31508
89. Wu C-H, Fallini C, Ticozzi N, Keagle PJ, Sapp PC, Piotrowska K, et al. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 2012;488: 499–503. doi:10.1038/nature11280
90. Chen Y, Zheng Z-Z, Huang R, Chen K, Song W, Zhao B, et al. PFN1 mutations are rare in Han Chinese populations with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*. Elsevier; 2013;34: 1922.e1–5. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.01.013
91. Fecto F, Yan J, Vemula SP, Liu E, Yang Y, Chen W, et al. SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*. American Medical Association; 2011;68: 1440–1446. doi:10.1001/archneurol.2011.250
92. Le Ber I, Camuzat A, Guerreiro R, Bouya-Ahmed K, Bras J, Nicolas G, et al. SQSTM1 mutations in French patients with frontotemporal dementia or frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol*. American Medical Association; 2013;70: 1403–1410. doi:10.1001/jamaneurol.2013.3849
93. Deng H-X, Chen W, Hong S-T, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*. 2011;477: 211–215. doi:10.1038/nature10353
94. Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chaussenot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, et al. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*. Oxford University Press; 2014;137: 2329–2345. doi:10.1093/brain/awu138
95. Blauw HM, Al-Chalabi A, Andersen PM, van Vught PWJ, Diekstra FP, van Es MA, et al. A large genome scan for rare CNVs in amyotrophic lateral sclerosis. *Human*



Molecular Genetics. Oxford University Press; 2010;19: 4091–4099.  
doi:10.1093/hmg/ddq323

96. Blauw HM, van Rheen W, Koppers M, Van Damme P, Waibel S, Lemmens R, et al. NIPA1 polyalanine repeat expansions are associated with amyotrophic lateral sclerosis. Human Molecular Genetics. Oxford University Press; 2012;21: 2497–2502. doi:10.1093/hmg/dds064
97. Talbot K, Ansorge O. Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: common pathways in neurodegenerative disease. Human Molecular Genetics. Oxford University Press; 2006;15 Spec No 2: R182–7. doi:10.1093/hmg/ddl202
98. Hand CK, Khoris J, Salachas F, Gros-Louis F, Lopes AAS, Mayeux-Portas V, et al. A novel locus for familial amyotrophic lateral sclerosis, on chromosome 18q. Am J Hum Genet. 2002;70: 251–256.
99. Sapp PC, Hosler BA, McKenna-Yasek D, Chin W, Gann A, Genise H, et al. Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. Am J Hum Genet. Elsevier; 2003;73: 397–403. doi:10.1086/377158
100. Couthouis J, Hart MP, Erion R, King OD, Diaz Z, Nakaya T, et al. Evaluating the role of the FUS/TLS-related gene EWSR1 in amyotrophic lateral sclerosis. Human Molecular Genetics. Oxford University Press; 2012;21: 2899–2911. doi:10.1093/hmg/dds116
101. Kim HJ, Kim NC, Wang Y-D, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. Nature. 2013;495: 467–473. doi:10.1038/nature11922
102. Le Ber I, Van Bortel I, Nicolas G, Bouya-Ahmed K, Camuzat A, Wallon D, et al. hnRNPA2B1 and hnRNPA1 mutations are rare in patients with “multisystem proteinopathy” and frontotemporal lobar degeneration phenotypes. Neurobiology of Aging. Elsevier; 2014;35: 934.e5–6. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.016
103. Couthouis J, Hart MP, Shorter J, DeJesus-Hernandez M, Erion R, Oristano R, et al. A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes. Proc Natl Acad Sci USA. National Acad Sciences; 2011;108: 20881–20890. doi:10.1073/pnas.1109434108
104. Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA, et al. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. Human Molecular Genetics. 1994;3: 1757–1761.
105. Smith BN, Ticozzi N, Fallini C, Gkazi AS, Topp S, Kenna KP, et al. Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS. NEURON. 2014;84: 324–331. doi:10.1016/j.neuron.2014.09.027

106. Fogh I, Ratti A, Gellera C, Lin K, Tiloca C, Moskvina V, et al. A genome-wide association meta-analysis identifies a novel locus at 17q11.2 associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press; 2014;23: 2220–2231. doi:10.1093/hmg/ddt587
107. Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, et al. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2015;347: 1436–1441. doi:10.1126/science.aaa3650
108. Mitchell J, Paul P, Chen H-J, Morris A, Payling M, Falchi M, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Acad Sciences; 2010;107: 7556–7561. doi:10.1073/pnas.0914128107
109. Corrado L, Carlomagno Y, Falasco L, Mellone S, Godi M, Cova E, et al. A novel peripherin gene (PRPH) mutation identified in one sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient. *Neurobiology of Aging*. Elsevier; 2011;32: 552.e1–6. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.02.011
110. Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 1992;326: 1464–1468. doi:10.1056/NEJM199205283262204
111. Fray AE, Ince PG, Banner SJ, Milton ID, Usher PA, Cookson MR, et al. The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci*. 1998;10: 2481–2489.
112. Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration*. 1995;4: 209–216.
113. Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Le Forestier N, et al. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci*. 2002;193: 73–78.
114. Liu D, Wen J, Liu J, Li L. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB J*. 1999;13: 2318–2328.
115. Casoni F, Basso M, Massignan T, Gianazza E, Cheroni C, Salmona M, et al. Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: possible multifunctional role in the pathogenesis. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2005;280: 16295–16304. doi:10.1074/jbc.M413111200

116. Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology*. 2004;62: 1758–1765.
117. Bogdanov M, Brown RH, Matson W, Smart R, Hayden D, O'Donnell H, et al. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic Biol Med*. 2000;29: 652–658.
118. Chang Y, Kong Q, Shan X, Tian G, Ilieva H, Cleveland DW, et al. Messenger RNA Oxidation Occurs Early in Disease Pathogenesis and Promotes Motor Neuron Degeneration in ALS. Cookson MR, editor. *PLoS ONE*. 2008;3: e2849–19. doi:10.1371/journal.pone.0002849
119. Dal Canto MC, Gurney ME. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 1994;145: 1271–1279.
120. Sasaki S, Iwata M. Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 1996;47: 535–540.
121. Higgins CMJ, Jung C, Ding H, Xu Z. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci*. 2002;22: RC215.
122. Vande Velde C, McDonald KK, Boukhedimi Y, McAlonis-Downes M, Lobsiger CS, Bel Hadj S, et al. Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. Dawson TM, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2011;6: e22031. doi:10.1371/journal.pone.0022031
123. Pickles S, Destroismaisons L, Peyrard SL, Cadot S, Rouleau GA, Brown RH, et al. Mitochondrial damage revealed by immunoselection for ALS-linked misfolded SOD1. *Human Molecular Genetics. Oxford University Press*; 2013;22: 3947–3959. doi:10.1093/hmg/ddt249
124. Browne SE, Bowling AC, Baik MJ, Gurney M, Brown RH, Beal MF. Metabolic dysfunction in familial, but not sporadic, amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 1998;71: 281–287.
125. Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, et al. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2002;277: 29626–29633. doi:10.1074/jbc.M203065200
126. Damiano M, Starkov AA, Petri S, Kipiani K, Kiaei M, Mattiazzi M, et al. Neural mitochondrial Ca<sup>2+</sup> capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem. Blackwell Publishing*

Ltd; 2006;96: 1349–1361. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03619.x

127. Li Q, Vande Velde C, Israelson A, Xie J, Bailey AO, Dong M-Q, et al. ALS-linked mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) alters mitochondrial protein composition and decreases protein import. *Proc Natl Acad Sci USA. National Acad Sciences*; 2010;107: 21146–21151. doi:10.1073/pnas.1014862107
128. Tradewell ML, Cooper LA, Minotti S, Durham HD. Calcium dysregulation, mitochondrial pathology and protein aggregation in a culture model of amyotrophic lateral sclerosis: mechanistic relationship and differential sensitivity to intervention. *Neurobiol Dis.* 2011;42: 265–275. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.016
129. Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V, et al. Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *NEURON.* 2010;67: 575–587. doi:10.1016/j.neuron.2010.07.019
130. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem. Annual Reviews*; 2005;74: 739–789. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134
131. Jaronen M, Goldsteins G, Koistinaho J. ER stress and unfolded protein response in amyotrophic lateral sclerosis-a controversial role of protein disulphide isomerase. *Front Cell Neurosci. Frontiers*; 2014;8: 402. doi:10.3389/fncel.2014.00402
132. Vaccaro A, Tauffenberger A, Ash PEA, Carlomagno Y, Petrucelli L, Parker JA. TDP-1/TDP-43 Regulates Stress Signaling and Age-Dependent Proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. Lu B, editor. *PLoS Genet.* 2012;8: e1002806. doi:10.1371/journal.pgen.1002806.s012
133. Vaccaro A, Patten SA, Aggad D, Julien C, Maios C, Kabashi E, et al. Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity in vivo. *Neurobiol Dis.* 2013;55: 64–75. doi:10.1016/j.nbd.2013.03.015
134. Desport JC, Preux PM, Magy L, Boirie Y, Vallat JM, Beaufrère B, et al. Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2001;74: 328–334.
135. Bouteloup C, Desport JC, Clavelou P, Guy N, Derumeaux-Burel H, Ferrier A, et al. Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *J Neurol. D. Steinkopff-Verlag*; 2009;256: 1236–1242. doi:10.1007/s00415-009-5100-z
136. Dupuis L, Pradat PF, Ludolph AC, Loeffler J-P. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol. Elsevier*; 2011;10: 75–82. doi:10.1016/S1474-4422(10)70224-6
137. O'Reilly ÉJ, Wang H, Weisskopf MG, Fitzgerald KC, Falcone G, McCullough ML, et al. Premorbid body mass index and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph*

Lateral Scler Frontotemporal Degener. 2013;14: 205–211.  
doi:10.3109/21678421.2012.735240

138. Fujita K, Yamauchi M, Shibayama K, Ando M, Honda M, Nagata Y. Decreased cytochrome c oxidase activity but unchanged superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* 1996;45: 276–281. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19960801)45:3<276::AID-JNR9>3.0.CO;2-A
139. Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Shaw PJ, Turnbull DM. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann Neurol.* 1999;46: 787–790.
140. Dupuis L, Oudart H, René F, Gonzalez de Aguilar J-L, Loeffler J-P. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences. National Acad Sciences;* 2004;101: 11159–11164. doi:10.1073/pnas.0402026101
141. Perera ND, Turner BJ. AMPK Signalling and Defective Energy Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurochem Res. Springer US;* 2016;41: 544–553. doi:10.1007/s11064-015-1665-3
142. Vanselow BK, Keller BU. Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *J Physiol (Lond). Wiley-Blackwell;* 2000;525 Pt 2: 433–445. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00433.x
143. Lewinski von F, Fuchs J, Vanselow BK, Keller BU. Low Ca<sup>2+</sup> buffering in hypoglossal motoneurons of mutant SOD1 (G93A) mice. *Neurosci Lett.* 2008;445: 224–228. doi:10.1016/j.neulet.2008.08.084
144. Aggad D, Veriepe J, Tauffenberger A, Parker JA. TDP-43 Toxicity Proceeds via Calcium Dysregulation and Necrosis in Aging *Caenorhabditis elegans* Motor Neurons. *Journal of Neuroscience.* 2014;34: 12093–12103. doi:10.1523/JNEUROSCI.2495-13.2014
145. Yamashita T, Teramoto S, Kwak S. Phosphorylated TDP-43 becomes resistant to cleavage by calpain: A regulatory role for phosphorylation in TDP-43 pathology of ALS/FTLD. *Neurosci Res.* 2015. doi:10.1016/j.neures.2015.12.006
146. Pieri M, Caioli S, Canu N, Mercuri NB, Guatteo E, Zona C. Over-expression of N-type calcium channels in cortical neurons from a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Exp Neurol.* 2013;247: 349–358. doi:10.1016/j.expneurol.2012.11.002
147. Sephton CF, Good SK, Atkin S, Dewey CM, Mayer P, Herz J, et al. TDP-43 Is a Developmentally Regulated Protein Essential for Early Embryonic Development.

Journal of Biological Chemistry. 2010;285: 6826–6834.  
doi:10.1074/jbc.M109.061846

148. Feiguin F, Godena VK, Romano G, D'Ambrogio A, Klima R, Baralle FE. Depletion of TDP-43 affects *Drosophila* motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. *FEBS Letters*. 2009;583: 1586–1592. doi:10.1016/j.febslet.2009.04.019
149. Riddle DL. *C. elegans* II. Firefly Books; 1997.
150. Zhang T, Hwang H-Y, Hao H, Talbot C, Wang J. *Caenorhabditis elegans* RNA-processing protein TDP-1 regulates protein homeostasis and life span. *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2012;287: 8371–8382. doi:10.1074/jbc.M111.311977
151. Therrien M, Rouleau GA, Dion PA, Parker JA. Deletion of C9ORF72 Results in Motor Neuron Degeneration and Stress Sensitivity in *C. elegans*. Dupuy D, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2013;8: e83450. doi:10.1371/journal.pone.0083450
152. Wang J, Farr GW, Hall DH, Li F, Furtak K, Dreier L, et al. An ALS-linked mutant SOD1 produces a locomotor defect associated with aggregation and synaptic dysfunction when expressed in neurons of *Caenorhabditis elegans*. Cox GA, editor. *PLoS Genet*. Public Library of Science; 2009;5: e1000350. doi:10.1371/journal.pgen.1000350
153. Li J, Li T, Zhang X, Tang Y, Yang J, Le W. Human superoxide dismutase 1 overexpression in motor neurons of *Caenorhabditis elegans* causes axon guidance defect and neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*. Elsevier; 2014;35: 837–846. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.003
154. Vaccaro A, Patten SA, Ciura S, Maios C, Therrien M, Drapeau P, et al. Methylene Blue Protects against TDP-43 and FUS Neuronal Toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*. Le W, editor. *PLoS ONE*. 2012;7: e42117. doi:10.1371/journal.pone.0042117.s002
155. Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci*. 2007;10: 608–614. doi:10.1038/nn1885
156. Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology*. 2001;57: 1282–1289.
157. Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2006;312: 1389–1392. doi:10.1126/science.1123511
158. Letiembre M, Liu Y, Walter S, Hao W, Pfander T, Wrede A, et al. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. *Neurobiology of Aging*. 2009;30: 759–768. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.018

159. Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien J-P, et al. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2010;58: 231–243. doi:10.1002/glia.20919
160. Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia*. 1998;23: 249–256. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199807)23:3<249::AID-GLIA7>3.0.CO;2-#
161. Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 1992;140: 691–707.
162. Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CCJ, Shaw CE, Brooks DJ, et al. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis*. 2004;15: 601–609. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.012
163. Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S, Eggan KC. Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell. Elsevier*; 2008;3: 637–648. doi:10.1016/j.stem.2008.09.017
164. Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, et al. Microglia induce motor neuron death via the classical NF- $\kappa$ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *NEURON*. 2014;81: 1009–1023. doi:10.1016/j.neuron.2014.01.013
165. Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, et al. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol*. 2011;29: 824–828. doi:10.1038/nbt.1957
166. Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci*. 2007;10: 615–622. doi:10.1038/nn1876
167. Xiao Q, Zhao W, Beers DR, Yen AA, Xie W, Henkel JS, et al. Mutant SOD1(G93A) microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *J Neurochem*. Blackwell Publishing Ltd; 2007;102: 2008–2019. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04677.x
168. Bowerman M, Vincent T, Scamps F, Perrin FE, Camu W, Raoul C. Neuroimmunity dynamics and the development of therapeutic strategies for amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci. Frontiers*; 2013;7: 214. doi:10.3389/fncel.2013.00214

169. Ren Z, Ambros VR. *Caenorhabditis elegans* microRNAs of the let-7 family act in innate immune response circuits and confer robust developmental timing against pathogen stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Acad Sciences; 2015;112: E2366–75. doi:10.1073/pnas.1422858112
170. De Felice B, Guida M, Guida M, Coppola C, De Mieri G, Cotrufo R. A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Gene*. 2012;508: 35–40. doi:10.1016/j.gene.2012.07.058
171. Kaul D, Habbel P, Derkow K, Krüger C, Franzoni E, Wulczyn FG, et al. Expression of Toll-like receptors in the developing brain. Alexopoulou L, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2012;7: e37767. doi:10.1371/journal.pone.0037767
172. Trotta T, Porro C, Calvello R, Panaro MA. Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *J Neuroimmunol*. 2014;268: 1–12. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.01.014
173. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. Oxford University Press; 2009;21: 317–337. doi:10.1093/intimm/dxp017
174. Casula M, Iyer AM, Spliet WGM, Anink JJ, Steentjes K, Sta M, et al. Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Neuroscience*. 2011;179: 233–243. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.02.001
175. Lee JY, Lee JD, Phipps S, Noakes PG, Woodruff TM. Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) extends survival in the hSOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*. BioMed Central; 2015;12: 90. doi:10.1186/s12974-015-0310-z
176. Liu Y, Hao W, Dawson A, Liu S, Fassbender K. Expression of amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutant increases the neurotoxic potential of microglia via TLR2. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2009;284: 3691–3699. doi:10.1074/jbc.M804446200
177. Nguyen MD. Exacerbation of Motor Neuron Disease by Chronic Stimulation of Innate Immunity in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroscience*. 2004;24: 1340–1349. doi:10.1523/JNEUROSCI.4786-03.2004
178. De Paola M, Sestito SE, Mariani A, Memo C, Fanelli R, Freschi M, et al. Synthetic and natural small molecule TLR4 antagonists inhibit motoneuron death in cultures from ALS mouse model. *Pharmacol Res*. 2016;103: 180–187. doi:10.1016/j.phrs.2015.11.020
179. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect*. 2009;11: 1050–1062. doi:10.1016/j.micinf.2009.08.013
180. Kalai M, Van Loo G, Vanden Berghe T, Meeus A, Burm W, Saelens X, et al. Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with



- interferon and dsRNA. *Cell Death Differ.* Nature Publishing Group; 2002;9: 981–994. doi:10.1038/sj.cdd.4401051
181. Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *The Journal of Immunology.* 2001;166: 6847–6854.
  182. Summers DW, DiAntonio A, Milbrandt J. Mitochondrial dysfunction induces Sarm1-dependent cell death in sensory neurons. *Journal of Neuroscience.* Society for Neuroscience; 2014;34: 9338–9350. doi:10.1523/JNEUROSCI.0877-14.2014
  183. Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.* 2004;23: 2825–2837. doi:10.1038/sj.onc.1207528
  184. Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol.* Blackwell Publishing Ltd; 2006;8: 1812–1825. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00751.x
  185. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; 2009;7: 99–109. doi:10.1038/nrmicro2070
  186. Diederich M, Cerella C. Non-canonical programmed cell death mechanisms triggered by natural compounds. *Semin Cancer Biol.* 2016. doi:10.1016/j.semcancer.2016.06.001
  187. Tichy ED, Stephan ZA, Osterburg A, Noel G, Stambrook PJ. Mouse embryonic stem cells undergo charontosis, a novel programmed cell death pathway dependent upon cathepsins, p53, and EndoG, in response to etoposide treatment. *Stem Cell Res.* 2013;10: 428–441. doi:10.1016/j.scr.2013.01.010
  188. Potze L, Di Franco S, Grandela C, Pras-Raves ML, Picavet DI, van Veen HA, et al. Betulinic acid induces a novel cell death pathway that depends on cardiolipin modification. *Oncogene.* Nature Publishing Group; 2016;35: 427–437. doi:10.1038/onc.2015.102
  189. Zhang Y, Cai R, Zhou R, Li Y, Liu L. Tosl-1-like kinase mediated a new type of cell death pathway in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* Nature Publishing Group; 2016;23: 146–157. doi:10.1038/cdd.2015.77
  190. Paschon V, Takada SH, Ikebara JM, Sousa E, Raeisossadati R, Ulrich H, et al. Interplay Between Exosomes, microRNAs and Toll-Like Receptors in Brain Disorders. *Mol Neurobiol.* Springer US; 2015;: 1–13. doi:10.1007/s12035-015-9142-1
  191. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* Society for Leukocyte Biology; 2007;81: 1–5. doi:10.1189/jlb.0306164

192. Mukherjee P, Winkler CW, Taylor KG, Woods TA, Nair V, Khan BA, et al. SARM1, Not MyD88, Mediates TLR7/TLR9-Induced Apoptosis in Neurons. *J Immunol. American Association of Immunologists*; 2015;: 1500953. doi:10.4049/jimmunol.1500953
193. Embacher N, Kaufmann WA, Beer R, Maier H, Jellinger KA, Poewe W, et al. Apoptosis signals in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: an immunocytochemical study. *Acta Neuropathol.* 2001;102: 426–434.
194. Barbosa LF, Cerqueira FM, Macedo AFA, Garcia CCM, Angeli JPF, Schumacher RI, et al. Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation, and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802: 462–471. doi:10.1016/j.bbadis.2010.01.011
195. Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ. Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. Andreu AL, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2010;5: e9386. doi:10.1371/journal.pone.0009386
196. Xia R, Liu Y, Yang L, Gal J, Zhu H, Jia J. Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a *Drosophila* model of Fus-mediated ALS. *Mol Neurodegener. BioMed Central*; 2012;7: 10. doi:10.1186/1750-1326-7-10
197. Dahlke C, Saberi D, Ott B, Brand-Saberi B, Schmitt-John T, Theiss C. Inflammation and neuronal death in the motor cortex of the wobbler mouse, an ALS animal model. *J Neuroinflammation. BioMed Central*; 2015;12: 215. doi:10.1186/s12974-015-0435-0
198. Migheli A, Atzori C, Piva R, Tortarolo M, Girelli M, Schiffer D, et al. Lack of apoptosis in mice with ALS. *Nat Med.* 1999;5: 966–967. doi:10.1038/12381
199. He BP, Strong MJ. Motor neuronal death in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is not apoptotic. A comparative study of ALS and chronic aluminium chloride neurotoxicity in New Zealand white rabbits. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2000;26: 150–160.
200. Gomes C, Palma AS, Almeida R, Regalla M, McCluskey LF, Trojanowski JQ, et al. Establishment of a cell model of ALS disease: Golgi apparatus disruption occurs independently from apoptosis. *Biotechnol Lett. Springer Netherlands*; 2008;30: 603–610. doi:10.1007/s10529-007-9595-z
201. Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, et al. Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *NEURON. Elsevier*; 2014;81: 1001–1008. doi:10.1016/j.neuron.2014.01.011
202. Gerdt J, Summers DW, Sasaki Y, DiAntonio A, Milbrandt J. Sarm1-mediated axon degeneration requires both SAM and TIR interactions. *J Neurosci. Society for*

Neuroscience; 2013;33: 13569–13580. doi:10.1523/JNEUROSCI.1197-13.2013

203. Loreto A, Di Stefano M, Gering M, Conforti L. Wallerian Degeneration Is Executed by an NMN-SARM1-Dependent Late Ca(2+) Influx but Only Modestly Influenced by Mitochondria. *CellReports*. Elsevier; 2015;13: 2539–2552. doi:10.1016/j.celrep.2015.11.032
204. Gerdtts J, Summers DW, Milbrandt J, DiAntonio A. Axon Self-Destruction: New Links among SARM1, MAPKs, and NAD<sup>+</sup> Metabolism. *NEURON*. Elsevier; 2016;89: 449–460. doi:10.1016/j.neuron.2015.12.023
205. Henninger N, Bouley J, Sikoglu EM, An J, Moore CM, King JA, et al. Attenuated traumatic axonal injury and improved functional outcome after traumatic brain injury in mice lacking Sarm1. *Brain*. Oxford University Press; 2016;139: 1094–1105. doi:10.1093/brain/aww001
206. Osterloh JM, Yang J, Rooney TM, Fox AN, Adalbert R, Powell EH, et al. dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2012;337: 481–484. doi:10.1126/science.1223899
207. Lin C-W, Liu H-Y, Chen C-Y, Hsueh Y-P. Neuronally-expressed Sarm1 regulates expression of inflammatory and antiviral cytokines in brains. *Innate Immun*. SAGE Publications; 2014;20: 161–172. doi:10.1177/1753425913485877
208. Gerdtts J, Brace EJ, Sasaki Y, DiAntonio A, Milbrandt J. Neurobiology. SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD<sup>+</sup> destruction. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2015;348: 453–457. doi:10.1126/science.1258366
209. Yang J, Wu Z, Renier N, Simon DJ, Uryu K, Park DS, et al. Pathological axonal death through a MAPK cascade that triggers a local energy deficit. *CELL*. Elsevier; 2015;160: 161–176. doi:10.1016/j.cell.2014.11.053
210. Xia Q, Hu Q, Wang H, Yang H, Gao F, Ren H, et al. Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia. *Cell Death Dis*. Nature Publishing Group; 2015;6: e1702. doi:10.1038/cddis.2015.69
211. Pocrnich CE, Liu H, Feng M, Peng T, Feng Q, Hutnik CML. p38 mitogen-activated protein kinase protects human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *Can J Ophthalmol*. Elsevier; 2009;44: 431–436. doi:10.3129/i09-109
212. Morfini GA, Bosco DA, Brown H, Gatto R, Kaminska A, Song Y, et al. Inhibition of fast axonal transport by pathogenic SOD1 involves activation of p38 MAP kinase. Borchelt DR, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2013;8: e65235. doi:10.1371/journal.pone.0065235

213. Zhan L, Xie Q, Tibbetts RS. Opposing roles of p38 and JNK in a *Drosophila* model of TDP-43 proteinopathy reveal oxidative stress and innate immunity as pathogenic components of neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press; 2015;24: 757–772. doi:10.1093/hmg/ddu493
214. Tortarolo M, Veglianese P, Calvaresi N, Botturi A, Rossi C, Giorgini A, et al. Persistent activation of p38 mitogen-activated protein kinase in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis correlates with disease progression. *Mol Cell Neurosci*. 2003;23: 180–192.
215. Holasek SS, Wengenack TM, Kandimalla KK, Montano C, Gregor DM, Curran GL, et al. Activation of the stress-activated MAP kinase, p38, but not JNK in cortical motor neurons during early presymptomatic stages of amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *Brain Research*. 2005;1045: 185–198. doi:10.1016/j.brainres.2005.03.037
216. Dewil M, Cruz dela VF, Van Den Bosch L, Robberecht W. Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase activation and mutant SOD1(G93A)-induced motor neuron death. *Neurobiol Dis*. 2007;26: 332–341. doi:10.1016/j.nbd.2006.12.023
217. Kurz CL, Tan M-W. Regulation of aging and innate immunity in *C. elegans*. *Aging Cell*. Blackwell Science Ltd; 2004;3: 185–193. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00108.x
218. Hall DH, Altun ZF. *C. elegans atlas*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2007.
219. Couillault C, Fourquet P, Pophillat M, Ewbank JJ. A UPR-independent infection-specific role for a BiP/GRP78 protein in the control of antimicrobial peptide expression in *C. elegans* epidermis. *virulence*. 2012;3: 299–308. doi:10.4161/viru.20384
220. Shivers RP, Pagano DJ, Kooistra T, Richardson CE, Reddy KC, Whitney JK, et al. Phosphorylation of the conserved transcription factor ATF-7 by PMK-1 p38 MAPK regulates innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. Ashrafi K, editor. *PLoS Genet*. Public Library of Science; 2010;6: e1000892. doi:10.1371/journal.pgen.1000892
221. Pujol N, Cypowyj S, Ziegler K, Millet A, Astrain A, Goncharov A, et al. Distinct Innate Immune Responses to Infection and Wounding in the *C. elegans* Epidermis. *Current Biology*. 2008;18: 481–489. doi:10.1016/j.cub.2008.02.079
222. Inoue H, Hisamoto N, An JH, Oliveira RP, Nishida E, Blackwell TK, et al. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes & Development*. Cold Spring Harbor Lab; 2005;19: 2278–2283. doi:10.1101/gad.1324805
223. Cheesman HK, Feinbaum RL, Thekkiniath J, Downen RH, Conery AL, Pukkila-Worley R. Aberrant Activation of p38 MAP Kinase-Dependent Innate Immune Responses Is

Toxic to *Caenorhabditis elegans*. G3 (Bethesda). Genetics Society of America; 2016;6: 541–549. doi:10.1534/g3.115.025650

224. Irazoqui JE, Urbach JM, Ausubel FM. Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nat Rev Immunol*. 2010;10: 47–58. doi:10.1038/nri2689
225. Kato Y, Aizawa T, Hoshino H, Kawano K, Nitta K, Zhang H. abf-1 and abf-2, ASABF-type antimicrobial peptide genes in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J*. Portland Press Ltd; 2002;361: 221–230.
226. Pujol N, Zugasti O, Wong D, Couillault C, Kurz CL, Schulenburg H, et al. Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. Ausubel FM, editor. *PLoS Pathog*. Public Library of Science; 2008;4: e1000105. doi:10.1371/journal.ppat.1000105
227. Wilkins C, Dishongh R, Moore SC, Whitt MA, Chow M, Machaca K. RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2005;436: 1044–1047. doi:10.1038/nature03957
228. Lu R, Yigit E, Li W-X, Ding S-W. An RIG-I-Like RNA helicase mediates antiviral RNAi downstream of viral siRNA biogenesis in *Caenorhabditis elegans*. Schneider DS, editor. *PLoS Pathog*. Public Library of Science; 2009;5: e1000286. doi:10.1371/journal.ppat.1000286
229. Iatsenko I, Sinha A, Rödelisperger C, Sommer RJ. New role for DCR-1/dicer in *Caenorhabditis elegans* innate immunity against the highly virulent bacterium *Bacillus thuringiensis* DB27. *Infect Immun*. American Society for Microbiology; 2013;81: 3942–3957. doi:10.1128/IAI.00700-13
230. Liu F, He C-X, Luo L-J, Zou Q-L, Zhao Y-X, Saini R, et al. Nuclear hormone receptor regulation of microRNAs controls innate immune responses in *C. elegans*. Ausubel FM, editor. *PLoS Pathog*. Public Library of Science; 2013;9: e1003545. doi:10.1371/journal.ppat.1003545
231. Guo X-K, Zhang Q, Gao L, Li N, Chen X-X, Feng W-H. Increasing expression of microRNA 181 inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and has implications for controlling virus infection. *J Virol*. American Society for Microbiology; 2013;87: 1159–1171. doi:10.1128/JVI.02386-12
232. Bandyopadhyay S, Long ME, Allen L-AH. Differential expression of microRNAs in *Francisella tularensis*-infected human macrophages: miR-155-dependent downregulation of MyD88 inhibits the inflammatory response. Metzger DW, editor. *PLoS ONE*. 2014;9: e109525. doi:10.1371/journal.pone.0109525
233. Saba R, Sorensen DL, Booth SA. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Front Immunol*. Frontiers; 2014;5: 578.

doi:10.3389/fimmu.2014.00578

234. Pujol N, Link EM, Liu LX, Kurz CL, Alloing G, Tan MW, et al. A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*. 2001;11: 809–821.
235. Pradel E, Zhang Y, Pujol N, Matsuyama T, Bargmann CI, Ewbank JJ. Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences; 2007;104: 2295–2300. doi:10.1073/pnas.0610281104
236. Styer KL, Singh V, Macosko E, Steele SE, Bargmann CI, Aballay A. Innate immunity in *Caenorhabditis elegans* is regulated by neurons expressing NPR-1/GPCR. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2008;322: 460–464. doi:10.1126/science.1163673
237. Reddy KC, Andersen EC, Kruglyak L, Kim DH. A polymorphism in *npr-1* is a behavioral determinant of pathogen susceptibility in *C. elegans*. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2009;323: 382–384. doi:10.1126/science.1166527
238. Ravits JM, La Spada AR. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2009;73: 805–811. doi:10.1212/WNL.0b013e3181b6bbbd
239. Hall D, Edsles H. Silent prions lying in wait: a two-hit model of prion/amyloid formation and infection. *J Mol Biol*. 2004;336: 775–786. doi:10.1016/j.jmb.2003.12.004
240. Münch C, O'Brien J, Bertolotti A. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Acad Sciences; 2011;108: 3548–3553. doi:10.1073/pnas.1017275108
241. Verma A, Tandan R. RNA quality control and protein aggregates in amyotrophic lateral sclerosis: A review. *Muscle Nerve*. 2013;47: 330–338. doi:10.1002/mus.23673
242. Gomes C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Evidence for secretion of Cu,Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2007;428: 43–46. doi:10.1016/j.neulet.2007.09.024
243. Sugaya K, Nakano I. Prognostic role of “prion-like propagation” in SOD1-linked familial ALS: an alternative view. *Front Cell Neurosci*. Frontiers; 2014;8: 359. doi:10.3389/fncel.2014.00359
244. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, et al. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *CellReports*.

2013;4: 124–134. doi:10.1016/j.celrep.2013.06.007

245. Smethurst P, Sidle KCL, Hardy J. Review: Prion-like mechanisms of transactive response DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015;41: 578–597. doi:10.1111/nan.12206
246. Tong J, Huang C, Bi F, Wu Q, Huang B, Liu X, et al. Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *EMBO J.* EMBO Press; 2013;32: 1917–1926. doi:10.1038/emboj.2013.122
247. Wächter N, Storch A, Hermann A. Human TDP-43 and FUS selectively affect motor neuron maturation and survival in a murine cell model of ALS by non-cell-autonomous mechanisms. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2015;16: 431–441. doi:10.3109/21678421.2015.1055275
248. Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Irwin DJ, Grossman M, et al. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2013;74: 20–38. doi:10.1002/ana.23937
249. Gousset K, Schiff E, Langevin C, Marijanovic Z, Caputo A, Browman DT, et al. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol.* 2009;11: 328–336. doi:10.1038/ncb1841
250. Betz A, Thakur P, Junge HJ, Ashery U, Rhee JS, Scheuss V, et al. Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *NEURON.* 2001;30: 183–196.
251. van Es MA, Veldink JH, Saris CGJ, Blauw HM, van Vught PWJ, Birve A, et al. Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics.* Nature Publishing Group; 2009;41: 1083–1087. doi:10.1038/ng.442
252. Diekstra FP, van Vught PWJ, van Rheenen W, Koppers M, Pasterkamp RJ, van Es MA, et al. UNC13A is a modifier of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging.* 2012;33: 630.e3–8. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.029
253. Diekstra FP, Van Deerlin VM, van Swieten JC, Al-Chalabi A, Ludolph AC, Weishaupt JH, et al. C9orf72 and UNC13A are shared risk loci for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a genome-wide meta-analysis. *Ann Neurol.* 2014;76: 120–133. doi:10.1002/ana.24198
254. Chiò A, Mora G, Restagno G, Brunetti M, Ossola I, Barberis M, et al. UNC13A influences survival in Italian amyotrophic lateral sclerosis patients: a population-based study. *Neurobiology of Aging.* 2013;34: 357.e1–5. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.016

255. Schoch S, Castillo PE, Jo T, Mukherjee K, Geppert M, Wang Y, et al. RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature*. Nature Publishing Group; 2002;415: 321–326. doi:10.1038/415321a
256. Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci. Annual Reviews*; 2004;27: 509–547. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412
257. Bello OD, Zanetti MN, Mayorga LS, Michaut MA. RIM, Munc13, and Rab3A interplay in acrosomal exocytosis. *Exp Cell Res*. 2012;318: 478–488. doi:10.1016/j.yexcr.2012.01.002
258. Brose N, Hofmann K, Hata Y, Südhof TC. Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *J Biol Chem*. 1995;270: 25273–25280.
259. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *CELL*. 1993;75: 843–854.
260. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Publishing Group*. 2013;14: 475–488. doi:10.1038/nrm3611
261. Couzigou J-M, Laouressergues D, Bécard G, Combier J-P. miRNA-encoded peptides (miPEPs): a new tool to analyse the roles of miRNAs in plant biology. *RNA Biol*. Taylor & Francis; 2015;; 0–00. doi:10.1080/15476286.2015.1094601
262. Malumbres M. miRNAs and cancer: an epigenetics view. *Mol Aspects Med*. 2013;34: 863–874. doi:10.1016/j.mam.2012.06.005
263. Fan Z, Chen X, Chen R. Transcriptome-wide analysis of TDP-43 binding small RNAs identifies miR-NID1 (miR-8485), a novel miRNA that represses NRXN1 expression. *Genomics*. 2014;103: 76–82. doi:10.1016/j.ygeno.2013.06.006
264. Buratti E, De Conti L, Stuardi C, Romano M, Baralle M, Baralle F. Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *FEBS Journal*. 2010;277: 2268–2281. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07643.x
265. Di Carlo V, Grossi E, Laneve P, Morlando M, Dini Modigliani S, Ballarino M, et al. TDP-43 regulates the microprocessor complex activity during in vitro neuronal differentiation. *Mol Neurobiol*. Springer US; 2013;48: 952–963. doi:10.1007/s12035-013-8564-x
266. Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, et al. Hepatitis B virus-specific miRNAs and Argonaute2 play a role in the viral life cycle. Ahn S-H, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2012;7: e47490. doi:10.1371/journal.pone.0047490
267. Decembrini S, Bressan D, Vignali R, Pitto L, Mariotti S, Rainaldi G, et al. MicroRNAs



- couple cell fate and developmental timing in retina. *Proc Natl Acad Sci USA. National Acad Sciences*; 2009;106: 21179–21184. doi:10.1073/pnas.0909167106
268. Song JT, Hu B, Qu HY, Bi CL, Huang XZ, Zhang M. Mechanical stretch modulates microRNA 21 expression, participating in proliferation and apoptosis in cultured human aortic smooth muscle cells. Peng T, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2012;7: e47657. doi:10.1371/journal.pone.0047657
  269. Havelange V, Garzon R. MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis. *Am J Hematol. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*; 2010;85: 935–942. doi:10.1002/ajh.21863
  270. Güller I, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *J Physiol (Lond). Blackwell Publishing Ltd*; 2010;588: 4075–4087. doi:10.1113/jphysiol.2010.194175
  271. Zhu H, Shyh-Chang N, Segrè AV, Shinoda G, Shah SP, Einhorn WS, et al. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *CELL*. 2011;147: 81–94. doi:10.1016/j.cell.2011.08.033
  272. Fernández-Hernando C, Yu J, Dávalos A, Prendergast J, Sessa WC. Endothelial-specific overexpression of caveolin-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol. Elsevier*; 2010;177: 998–1003. doi:10.2353/ajpath.2010.091287
  273. Yang W, Lee DY, Ben-David Y. The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. e-Century Publishing Corporation*; 2011;3: 140–155.
  274. Skalsky RL, Cullen BR. Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu Rev Microbiol. Annual Reviews*; 2010;64: 123–141. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134243
  275. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med*. 2007;13: 486–491. doi:10.1038/nm1569
  276. Ha T-Y. The Role of MicroRNAs in Regulatory T Cells and in the Immune Response. *Immune Netw*. 2011;11: 11–41. doi:10.4110/in.2011.11.1.11
  277. Xu L, Yang B-F, Ai J. MicroRNA transport: a new way in cell communication. *J Cell Physiol. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*; 2013;228: 1713–1719. doi:10.1002/jcp.24344
  278. Thompson-Peer KL, Bai J, Hu Z, Kaplan JM. HBL-1 patterns synaptic remodeling in *C. elegans*. *NEURON*. 2012;73: 453–465. doi:10.1016/j.neuron.2011.11.025

279. Simon DJ, Madison JM, Conery AL, Thompson-Peer KL, Soskis M, Ruvkun GB, et al. The microRNA miR-1 regulates a MEF-2-dependent retrograde signal at neuromuscular junctions. *CELL. Elsevier*; 2008;133: 903–915. doi:10.1016/j.cell.2008.04.035
280. Ebert MS, Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *CELL*. 2012;149: 515–524. doi:10.1016/j.cell.2012.04.005
281. Cao X, Pfaff SL, Gage FH. A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes & Development. Cold Spring Harbor Lab*; 2007;21: 531–536. doi:10.1101/gad.1519207
282. Xu X-L, Li Y, Wang F, Gao F-B. The steady-state level of the nervous-system-specific microRNA-124a is regulated by dFMR1 in *Drosophila*. *J Neurosci. Society for Neuroscience*; 2008;28: 11883–11889. doi:10.1523/JNEUROSCI.4114-08.2008
283. Rajasethupathy P, Fiumara F, Sheridan R, Betel D, Puthanveetil SV, Russo JJ, et al. Characterization of small RNAs in *Aplysia* reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *NEURON. Elsevier*; 2009;63: 803–817. doi:10.1016/j.neuron.2009.05.029
284. Chandrasekar V, Dreyer J-L. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Mol Cell Neurosci*. 2009;42: 350–362. doi:10.1016/j.mcn.2009.08.009
285. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol. BioMed Central Ltd*; 2004;5: R13. doi:10.1186/gb-2004-5-3-r13
286. Stappert L, Borghese L, Roesse-Koerner B, Weinhold S, Koch P, Terstegge S, et al. MicroRNA-based promotion of human neuronal differentiation and subtype specification. Rameshwar P, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2013;8: e59011. doi:10.1371/journal.pone.0059011
287. Somel M, Guo S, Fu N, Yan Z, Hu HY, Xu Y, et al. MicroRNA, mRNA, and protein expression link development and aging in human and macaque brain. *Genome Res. Cold Spring Harbor Lab*; 2010;20: 1207–1218. doi:10.1101/gr.106849.110
288. Zou Y, Chiu H, Zinovyeva A, Ambros V, Chuang C-F, Chang C. Developmental decline in neuronal regeneration by the progressive change of two intrinsic timers. *Science. American Association for the Advancement of Science*; 2013;340: 372–376. doi:10.1126/science.1231321
289. Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol. American Society of Plant Biologists*; 2003;132: 709–717.

doi:10.1104/pp.103.023630

290. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003;9: 277–279. doi:10.1261/rna.2183803
291. Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, Götberg M, Erlinge D. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology*. Karger Publishers; 2011;118: 217–226. doi:10.1159/000328869
292. Weber DG, Casjens S, Rozynek P, Lehnert M, Zilch-Schöneweis S, Bryk O, et al. Assessment of mRNA and microRNA Stabilization in Peripheral Human Blood for Multicenter Studies and Biobanks. *Biomark Insights*. Libertas Academica; 2010;5: 95–102.
293. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*. American Association for Cancer Research; 2009;15: 5473–5477. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0736
294. Freischmidt A, Iler KM, Ludolph AC, Weishaupt JH. Systemic dysregulation of TDP-43 binding microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. 2013;1: 1–1. doi:10.1186/2051-5960-1-42
295. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem*. 2002;48: 1647–1653.
296. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. Nature Publishing Group; 2008;18: 997–1006. doi:10.1038/cr.2008.282
297. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Acad Sciences; 2008;105: 10513–10518. doi:10.1073/pnas.0804549105
298. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. Hill AF, editor. *PLoS ONE*. 2011;6: e20769. doi:10.1371/journal.pone.0020769
299. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Acad Sciences; 2011;108: 5003–5008. doi:10.1073/pnas.1019055108

300. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9: 654–659. doi:10.1038/ncb1596
301. Belting M, Wittrup A. Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol.* Rockefeller Univ Press; 2008;183: 1187–1191. doi:10.1083/jcb.200810038
302. Zhu H, Fan G-C. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis.* e-Century Publishing Corporation; 2011;1: 138–149.
303. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications.* Nature Publishing Group; 2013;4: 2980. doi:10.1038/ncomms3980
304. Thayanithy V, Dickson EL, Steer C, Subramanian S, Lou E. Tumor-stromal cross talk: direct cell-to-cell transfer of oncogenic microRNAs via tunneling nanotubes. *Transl Res.* 2014;164: 359–365. doi:10.1016/j.trsl.2014.05.011
305. Wang F, Xue X, Wei J, An Y, Yao J, Cai H, et al. hsa-miR-520h downregulates ABCG2 in pancreatic cancer cells to inhibit migration, invasion, and side populations. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 2010;103: 567–574. doi:10.1038/sj.bjc.6605724
306. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 2010;78: 838–848. doi:10.1038/ki.2010.278
307. Xu D, Tahara H. The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65: 368–375. doi:10.1016/j.addr.2012.07.010
308. Lehmann SM, Krüger C, Park B, Derkow K, Rosenberger K, Baumgart J, et al. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci.* Nature Publishing Group; 2012;15: 827–835. doi:10.1038/nn.3113
309. Gantier MP. New perspectives in MicroRNA regulation of innate immunity. *J Interferon Cytokine Res.* Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2010;30: 283–289. doi:10.1089/jir.2010.0037
310. Fabbri M. TLRs as miRNA receptors. *Cancer Res.* American Association for Cancer Research; 2012;72: 6333–6337. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3229
311. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl*

Acad Sci USA. National Acad Sciences; 2012;109: E2110–6.  
doi:10.1073/pnas.1209414109

312. Gysler SM, Mulla MJ, Guerra M, Brosens JJ, Salmon JE, Chamley LW, et al. Antiphospholipid Antibody-Induced miR-146a-3p Drives Trophoblast Interleukin-8 Secretion Through Activation of Toll-like Receptor 8. *Mol Hum Reprod*. Oxford University Press; 2016;: gaw027. doi:10.1093/molehr/gaw027
313. Huang Z, Gan J, Long Z, Guo G, Shi X, Wang C, et al. Targeted delivery of let-7b to reprogramme tumor-associated macrophages and tumor infiltrating dendritic cells for tumor rejection. *Biomaterials*. 2016;90: 72–84.  
doi:10.1016/j.biomaterials.2016.03.009
314. He S, Chu J, Wu L-C, Mao H, Peng Y, Alvarez-Breckenridge CA, et al. MicroRNAs activate natural killer cells through Toll-like receptor signaling. *Blood*. 2013;121: 4663–4671. doi:10.1182/blood-2012-07-441360
315. He X, Jing Z, Cheng G. MicroRNAs: new regulators of Toll-like receptor signalling pathways. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014: 945169–14. doi:10.1155/2014/945169
316. Quinn SR, O'Neill LA. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *Int Immunol*. Oxford University Press; 2011;23: 421–425.  
doi:10.1093/intimm/dxr034
317. Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhata R, et al. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*. Nature Publishing Group; 2006;13: 13–21.  
doi:10.1038/nsmb1041
318. Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. Nature Publishing Group; 2004;432: 235–240. doi:10.1038/nature03120
319. Armakola M, Higgins MJ, Figley MD, Barmada SJ, Scarborough EA, Diaz Z, et al. Armakola 2012 Nature genetics. *Nature Genetics*. Nature Publishing Group; 2012;44: 1302–1309. doi:10.1038/ng.2434
320. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2004;303: 95–98. doi:10.1126/science.1090599
321. Park J-E, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, et al. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*. Nature Publishing Group; 2011;475: 201–205. doi:10.1038/nature10198
322. Kim Y, Kim VN. MicroRNA factory: RISC assembly from precursor microRNAs.

Molecular Cell. 2012;46: 384–386. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.012

- 323. Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*. Springer-Verlag; 2010;284: 95–103. doi:10.1007/s00438-010-0556-1
- 324. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *CELL*. Elsevier; 2005;120: 635–647. doi:10.1016/j.cell.2005.01.014
- 325. Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res. American Association for Cancer Research*; 2005;65: 7065–7070. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1783
- 326. Li Y, Kowdley KV. MicroRNAs in common human diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2012;10: 246–253. doi:10.1016/j.gpb.2012.07.005
- 327. Amin ND, Bai G, Klug JR, Bonanomi D, Pankratz MT, Gifford WD, et al. Loss of motoneuron-specific microRNA-218 causes systemic neuromuscular failure. *Science. American Association for the Advancement of Science*; 2015;350: 1525–1529. doi:10.1126/science.aad2509
- 328. Valdez G, Heyer MP, Feng G, Sanes JR. The role of muscle microRNAs in repairing the neuromuscular junction. Mei L, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2014;9: e93140. doi:10.1371/journal.pone.0093140
- 329. Bilen J, Liu N, Burnett BG, Pittman RN, Bonini NM. MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Molecular Cell*. Elsevier; 2006;24: 157–163. doi:10.1016/j.molcel.2006.07.030
- 330. Gascon E, Gao F-B. Cause or Effect: Misregulation of microRNA Pathways in Neurodegeneration. *Front Neurosci. Frontiers*; 2012;6: 48. doi:10.3389/fnins.2012.00048
- 331. Goodall EF, Heath PR, Bandmann O, Kirby J, Shaw PJ. Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Front Cell Neurosci. Frontiers*; 2013;7: 178. doi:10.3389/fncel.2013.00178
- 332. Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, et al. TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol*. 2010;120: 75–84. doi:10.1007/s00401-010-0678-x
- 333. Zhao H-Q, Zhang P, Gao H, He X, Dou Y, Huang AY, et al. Profiling the RNA editomes of wild-type *C. elegans* and ADAR mutants. *Genome Res. Cold Spring Harbor Lab*; 2015;25: 66–75. doi:10.1101/gr.176107.114
- 334. Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Tsuji S, Kakita A, Takahashi H, et al. Profound

- downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. *Neurobiol Dis.* 2012;45: 1121–1128. doi:10.1016/j.nbd.2011.12.033
335. Hideyama T, Teramoto S, Hachiga K, Yamashita T, Kwak S. Co-Occurrence of TDP-43 Mislocalization with Reduced Activity of an RNA Editing Enzyme, ADAR2, in Aged Mouse Motor Neurons. Kano MR, editor. *PLoS ONE.* 2012;7: e43469–7. doi:10.1371/journal.pone.0043469
  336. Gascon E, Gao F-B. The Emerging Roles of MicroRNAs in the Pathogenesis of Frontotemporal Dementia–Amyotrophic Lateral Sclerosis (FTD-ALS) Spectrum Disorders. *J Neurogenet.* 2014;28: 30–40. doi:10.3109/01677063.2013.876021
  337. Kim KY, Lee H-W, Shim Y-M, Mook-Jung I, Jeon GS, Sung J-J. A phosphomimetic mutant TDP-43 (S409/410E) induces Drosha instability and cytotoxicity in Neuro 2A cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;464: 236–243. doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.125
  338. Haramati S, Chapnik E, Sztainberg Y, Eilam R, Zwang R, Gershoni N, et al. miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci USA. National Acad Sciences;* 2010;107: 13111–13116. doi:10.1073/pnas.1006151107
  339. Ballarino M, Jobert L, Dembélé D, la Grange de P, Auboeuf D, Tora L. TAF15 is important for cellular proliferation and regulates the expression of a subset of cell cycle genes through miRNAs. *Oncogene.* 2013;32: 4646–4655. doi:10.1038/onc.2012.490
  340. McCann C, Holohan EE, Das S, Dervan A, Larkin A, Lee JA, et al. The Ataxin-2 protein is required for microRNA function and synapse-specific long-term olfactory habituation. *Proc Natl Acad Sci USA. National Acad Sciences;* 2011;108: E655–62. doi:10.1073/pnas.1107198108
  341. Zhang Z, Almeida S, Lu Y, Nishimura AL, Peng L, Sun D, et al. Downregulation of microRNA-9 in iPSC-derived neurons of FTD/ALS patients with TDP-43 mutations. Pandey U, editor. *PLoS ONE.* 2013;8: e76055. doi:10.1371/journal.pone.0076055
  342. Morlando M, Dini Modigliani S, Torrelli G, Rosa A, Di Carlo V, Caffarelli E, et al. FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. *EMBO J. EMBO Press;* 2012;31: 4502–4510. doi:10.1038/emboj.2012.319
  343. Campos-Melo D, Droppelmann CA, He Z, Volkening K, Strong MJ. Altered microRNA expression profile in amyotrophic lateral sclerosis: a role in the regulation of NFL mRNA levels. *Molecular Brain. Molecular Brain;* 2013;6: 1–1. doi:10.1186/1756-6606-6-26
  344. Koval ED, Shaner C, Zhang P, Maine du X, Fischer K, Tay J, et al. Method for widespread microRNA-155 inhibition prolongs survival in ALS-model mice. *Human*

Molecular Genetics. Oxford University Press; 2013;22: 4127–4135.  
doi:10.1093/hmg/ddt261

345. Parisi C, Arisi I, D'Ambrosi N, Storti AE, Brandi R, D'Onofrio M, et al. Dysregulated microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis microglia modulate genes linked to neuroinflammation. *Cell Death Dis.* Nature Publishing Group; 2013;4: e959.  
doi:10.1038/cddis.2013.491
346. Benigni M, Ricci C, Jones AR, Giannini F, Al-Chalabi A, Battistini S. Identification of miRNAs as Potential Biomarkers in Cerebrospinal Fluid from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Neuromolecular Med.* Springer US; 2016;: 1–10.  
doi:10.1007/s12017-016-8396-8
347. Figueroa-Romero C, Hur J, Lunn JS, Paez-Colasante X, Bender DE, Yung R, et al. Expression of microRNAs in human post-mortem amyotrophic lateral sclerosis spinal cords provides insight into disease mechanisms. *Mol Cell Neurosci.* 2016;71: 34–45. doi:10.1016/j.mcn.2015.12.008
348. Tasca E, Pegoraro V, Merico A, Angelini C. Circulating microRNAs as biomarkers of muscle differentiation and atrophy in ALS. *Clin Neuropathol.* 2016;35: 22–30.  
doi:10.5414/NP300889
349. Dobrowolny G, Bernardini C, Martini M, Baranzini M, Barba M, Musarò A. Muscle Expression of SOD1(G93A) Modulates microRNA and mRNA Transcription Pattern Associated with the Myelination Process in the Spinal Cord of Transgenic Mice. *Front Cell Neurosci.* Frontiers; 2015;9: 463. doi:10.3389/fncel.2015.00463
350. Williams AH, Valdez G, Moresi V, Qi X, McAnally J, Elliott JL, et al. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science.* American Association for the Advancement of Science; 2009;326: 1549–1554. doi:10.1126/science.1181046
351. Toivonen JM, Manzano R, Oliván S, Zaragoza P, García-Redondo A, Osta R. MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. Cai H, editor. *PLoS ONE.* 2014;9: e89065.  
doi:10.1371/journal.pone.0089065
352. Freischmidt A, Muller K, Zondler L, Weydt P, Volk AE, Bo i AL, et al. Serum microRNAs in patients with genetic amyotrophic lateral sclerosis and pre-manifest mutation carriers. *Brain.* 2014;137: 2938–2950. doi:10.1093/brain/awu249
353. Emde A, Eitan C, Liou L-L, Libby RT, Rivkin N, Magen I, et al. Dysregulated miRNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS. *EMBO J.* EMBO Press; 2015;34: 2633–2651.  
doi:10.15252/emboj.201490493
354. Morel L, Regan M, Higashimori H, Ng SK, Esau C, Vidensky S, et al. Neuronal



exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2013;288: 7105–7116. doi:10.1074/jbc.M112.410944

355. Yang Y, Cai B, Fan D-S. [Expression of microRNA-29b in mice with amyotrophic lateral sclerosis]. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2015;47: 733–736.
356. Parisi C, Napoli G, Amadio S, Spalloni A, Apolloni S, Longone P, et al. MicroRNA-125b regulates microglia activation and motor neuron death in ALS. *Cell Death Differ*. Nature Publishing Group; 2016;23: 531–541. doi:10.1038/cdd.2015.153
357. Li Z, Lu Y, Xu X-L, Gao F-B. The FTD/ALS-associated RNA-binding protein TDP-43 regulates the robustness of neuronal specification through microRNA-9a in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press; 2013;22: 218–225. doi:10.1093/hmg/ddt420
358. Shioya M, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Saito Y, Ishida T, et al. Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3. *Neuropathol Appl Neurobiol*. Blackwell Publishing Ltd; 2010;36: 320–330. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01076.x
359. Wakabayashi K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H. Analysis of microRNA from archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun*. BioMed Central; 2014;2: 173. doi:10.1186/s40478-014-0173-z
360. De Felice B, Annunziata A, Fiorentino G, Borra M, Biffali E, Coppola C, et al. miR-338-3p is over-expressed in blood, CFS, serum and spinal cord from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurogenetics*. Springer Berlin Heidelberg; 2014;15: 243–253. doi:10.1007/s10048-014-0420-2
361. Abbott AL, Alvarez-Saavedra E, Miska EA, Lau NC, Bartel DP, Horvitz HR, et al. The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Cell*. 2005;9: 403–414. doi:10.1016/j.devcel.2005.07.009
362. Zhou F, Guan Y, Chen Y, Zhang C, Yu L, Gao H, et al. miRNA-9 expression is upregulated in the spinal cord of G93A-SOD1 transgenic mice. *Int J Clin Exp Pathol*. e-Century Publishing Corporation; 2013;6: 1826–1838.
363. Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, et al. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. Wölfl S, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2010;5: e13247. doi:10.1371/journal.pone.0013247

364. Sanuki R, Onishi A, Koike C, Muramatsu R, Watanabe S, Muranishi Y, et al. miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. *Nat Neurosci*. 2011;14: 1125–1134. doi:10.1038/nn.2897
365. Karres JS, Hilgers V, Carrera I, Treisman J, Cohen SM. The conserved microRNA miR-8 tunes atrophin levels to prevent neurodegeneration in *Drosophila*. *CELL*. Elsevier; 2007;131: 136–145. doi:10.1016/j.cell.2007.09.020
366. Park C-K, Xu Z-Z, Berta T, Han Q, Chen G, Liu X-J, et al. Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1. *NEURON*. 2014;82: 47–54. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.011
367. Sokol NS, Xu P, Jan Y-N, Ambros V. *Drosophila* let-7 microRNA is required for remodeling of the neuromusculature during metamorphosis. *Genes & Development*. Cold Spring Harbor Lab; 2008;22: 1591–1596. doi:10.1101/gad.1671708
368. Cho KJ, Song J, Oh Y, Lee JE. MicroRNA-Let-7a regulates the function of microglia in inflammation. *Mol Cell Neurosci*. 2015;68: 167–176. doi:10.1016/j.mcn.2015.07.004
369. Toledano H. The role of the heterochronic microRNA let-7 in the progression of aging. *Exp Gerontol*. 2013;48: 667–670. doi:10.1016/j.exger.2012.08.006
370. Nussbaum-Krammer CI, Morimoto RI. *Caenorhabditis elegans* as a model system for studying non-cell-autonomous mechanisms in protein-misfolding diseases. *Disease Models & Mechanisms*. 2014;7: 31–39. doi:10.1242/dmm.013011
371. Vaccaro A, Tauffenberger A, Aggad D, Rouleau G, Drapeau P, Parker JA. Mutant TDP-43 and FUS Cause Age-Dependent Paralysis and Neurodegeneration in *C. elegans*. Petrucelli L, editor. *PLoS ONE*. 2012;7: e31321. doi:10.1371/journal.pone.0031321.s013
372. Schwab C, Arai T, Hasegawa M, Yu S, McGeer PL. Colocalization of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 and huntingtin in inclusions of Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. The Oxford University Press; 2008;67: 1159–1165. doi:10.1097/NEN.0b013e31818e8951
373. Veriepe J, Fossouo L, Parker JA. Neurodegeneration in *C. elegans* models of ALS requires TIR-1/Sarm1 immune pathway activation in neurons. *Nature Communications*. Nature Publishing Group; 2015;6: 7319. doi:10.1038/ncomms8319
374. Altun ZF, Hall DH. Nervous system, general description. *WormAtlas*. doi; 2011.
375. Niebroj-Dobosz I, Janik P. Amino acids acting as transmitters in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Acta Neurol Scand*. 1999;100: 6–11.

376. Petri S, Krampfl K, Hashemi F, Grothe C, Hori A, Dengler R, et al. Distribution of GABAA receptor mRNA in the motor cortex of ALS patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62: 1041–1051.
377. Lorenzo L-E, Barbe A, Portalier P, Fritschy J-M, Bras H. Differential expression of GABAA and glycine receptors in ALS-resistant vs. ALS-vulnerable motoneurons: possible implications for selective vulnerability of motoneurons. *Eur J Neurosci*. Blackwell Publishing Ltd; 2006;23: 3161–3170. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04863.x
378. Freischmidt A, Müller K, Zondler L, Weydt P, Mayer B, Arnim von CAF, et al. Serum microRNAs in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*. 2015;36: 2660.e15–20. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.06.003
379. Busa WB, Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol*. 1984;246: R409–38.
380. Wadsworth WG, Riddle DL. Acidic intracellular pH shift during *Caenorhabditis elegans* larval development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences; 1988;85: 8435–8438.
381. Dodge JC, Treleaven CM, Fidler JA, Tamsett TJ, Bao C, Searles M, et al. Metabolic signatures of amyotrophic lateral sclerosis reveal insights into disease pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Acad Sciences; 2013;110: 10812–10817. doi:10.1073/pnas.1308421110
382. Syntichaki P, Samara C, Tavernarakis N. The vacuolar H<sup>+</sup> -ATPase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Current Biology*. Elsevier; 2005;15: 1249–1254. doi:10.1016/j.cub.2005.05.057
383. Tandan R, Bromberg MB, Forsheew D, Fries TJ, Badger GJ, Carpenter J, et al. A controlled trial of amino acid therapy in amyotrophic lateral sclerosis: I. Clinical, functional, and maximum isometric torque data. *Neurology*. 1996;47: 1220–1226.
384. Cudkowicz ME, Shefner JM, Schoenfeld DA, Brown RH, Johnson H, Qureshi M, et al. A randomized, placebo-controlled trial of topiramate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2003;61: 456–464.
385. Schaefer A, O'Carroll D, Tan CL, Hillman D, Sugimori M, Llinas R, et al. Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med*. Rockefeller Univ Press; 2007;204: 1553–1558. doi:10.1084/jem.20070823
386. Cuellar TL, Davis TH, Nelson PT, Loeb GB, Harfe BD, Ullian E, et al. Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Acad Sciences; 2008;105: 5614–5619. doi:10.1073/pnas.0801689105

387. Damiani D, Alexander JJ, O'Rourke JR, McManus M, Jadhav AP, Cepko CL, et al. Dicer inactivation leads to progressive functional and structural degeneration of the mouse retina. *J Neurosci. Society for Neuroscience*; 2008;28: 4878–4887. doi:10.1523/JNEUROSCI.0828-08.2008
388. Davis TH, Cuellar TL, Koch SM, Barker AJ, Harfe BD, McManus MT, et al. Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J Neurosci. Society for Neuroscience*; 2008;28: 4322–4330. doi:10.1523/JNEUROSCI.4815-07.2008
389. Tao J, Wu H, Lin Q, Wei W, Lu X-H, Cattle JP, et al. Deletion of astroglial Dicer causes non-cell-autonomous neuronal dysfunction and degeneration. *J Neurosci. Society for Neuroscience*; 2011;31: 8306–8319. doi:10.1523/JNEUROSCI.0567-11.2011
390. Shin D, Shin J-Y, McManus MT, Ptáček LJ, Fu Y-H. Dicer ablation in oligodendrocytes provokes neuronal impairment in mice. *Ann Neurol. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*; 2009;66: 843–857. doi:10.1002/ana.21927
391. Pereira JA, Baumann R, Norrmén C, Somandin C, Miehle M, Jacob C, et al. Dicer in Schwann cells is required for myelination and axonal integrity. *J Neurosci. Society for Neuroscience*; 2010;30: 6763–6775. doi:10.1523/JNEUROSCI.0801-10.2010
392. Verrier JD, Semple-Rowland S, Madorsky I, Papin JE, Notterpek L. Reduction of Dicer impairs Schwann cell differentiation and myelination. *J Neurosci Res. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*; 2010;88: 2558–2568. doi:10.1002/jnr.22418
393. Stark KL, Xu B, Bagchi A, Lai W-S, Liu H, Hsu R, et al. Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nature Genetics*. 2008;40: 751–760. doi:10.1038/ng.138
394. Fénelon K, Mukai J, Xu B, Hsu P-K, Drew LJ, Karayiorgou M, et al. Deficiency of *Dgcr8*, a gene disrupted by the 22q11.2 microdeletion, results in altered short-term plasticity in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA. National Acad Sciences*; 2011;108: 4447–4452. doi:10.1073/pnas.1101219108
395. Schofield CM, Hsu R, Barker AJ, Gertz CC, Blelloch R, Ullian EM. Monoallelic deletion of the microRNA biogenesis gene *Dgcr8* produces deficits in the development of excitatory synaptic transmission in the prefrontal cortex. *Neural Dev. BioMed Central*; 2011;6: 11. doi:10.1186/1749-8104-6-11
396. Rüegger S, Grosshans H. MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends Biochem Sci*. 2012;37: 436–446. doi:10.1016/j.tibs.2012.07.002
397. Ramachandran V, Chen X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science. American Association for the Advancement of Science*; 2008;321: 1490–1492. doi:10.1126/science.1163728

398. Bossé GD, Rüegger S, Ow MC, Vasquez-Rifo A, Rondeau EL, Ambros VR, et al. The decapping scavenger enzyme DCS-1 controls microRNA levels in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Cell*. 2013;50: 281–287. doi:10.1016/j.molcel.2013.02.023
399. Meziane O, Piquet S, Bossé GD, Gagné D, Paquet E, Robert C, et al. The human decapping scavenger enzyme DcpS modulates microRNA turnover. *Sci Rep. Nature Publishing Group*; 2015;5: 16688. doi:10.1038/srep16688
400. Madison JM, Nurrish S, Kaplan JM. UNC-13 interaction with syntaxin is required for synaptic transmission. *Current Biology*. 2005;15: 2236–2242. doi:10.1016/j.cub.2005.10.049
401. Speese S, Petrie M, Schuske K, Ailion M, Ann K, Iwasaki K, et al. UNC-31 (CAPS) is required for dense-core vesicle but not synaptic vesicle exocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci. Society for Neuroscience*; 2007;27: 6150–6162. doi:10.1523/JNEUROSCI.1466-07.2007
402. Xiang M, Zeng Y, Yang R, Xu H, Chen Z, Zhong J, et al. U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454: 210–214. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.064
403. Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*. 2010;50: 237–243. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.010
404. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature. Nature Publishing Group*; 2000;403: 901–906. doi:10.1038/35002607
405. Aitlhadj L, Stürzenbaum SR. The use of FUDR can cause prolonged longevity in mutant nematodes. *Mech Ageing Dev*. 2010;131: 364–365. doi:10.1016/j.mad.2010.03.002
406. Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Research. Oxford University Press*; 2012;40: 10937–10949. doi:10.1093/nar/gks832
407. Olivieri F, Rippo MR, Prattichizzo F, Babini L, Graciotti L, Recchioni R, et al. Toll like receptor signaling in “inflammaging”: microRNA as new players. *Immun Ageing. BioMed Central*; 2013;10: 11. doi:10.1186/1742-4933-10-11
408. Walia RR, Xue LC, Wilkins K, El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. RNABindRPlus: a predictor that combines machine learning and sequence homology-based methods to improve the reliability of predicted RNA-binding residues in proteins. Kurgan L, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2014;9: e97725. doi:10.1371/journal.pone.0097725

409. Xu G, Zhang Z, Xing Y, Wei J, Ge Z, Liu X, et al. MicroRNA-149 negatively regulates TLR-triggered inflammatory response in macrophages by targeting MyD88. *J Cell Biochem.* 2014;115: 919–927. doi:10.1002/jcb.24734
410. Liu X, Gong J, Xu B. miR-143 down-regulates TLR2 expression in hepatoma cells and inhibits hepatoma cell proliferation and invasion. *Int J Clin Exp Pathol.* e-Century Publishing Corporation; 2015;8: 12738–12747.
411. Xia X, Li Z, Liu K, Wu Y, Jiang D, Lai Y. Staphylococcal LTA-Induced miR-143 Inhibits *Propionibacterium acnes*-Mediated Inflammatory Response in Skin. *J Invest Dermatol.* 2016;136: 621–630. doi:10.1016/j.jid.2015.12.024
412. Luo W, Lin S, Li G, Nie Q, Zhang X. Integrative Analyses of miRNA-mRNA Interactions Reveal let-7b, miR-128 and MAPK Pathway Involvement in Muscle Mass Loss in Sex-Linked Dwarf Chickens. *Int J Mol Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2016;17: 276. doi:10.3390/ijms17030276
413. Li D, Jia H, Zhang H, Lv M, Liu J, Zhang Y, et al. TLR4 signaling induces the release of microparticles by tumor cells that regulate inflammatory cytokine IL-6 of macrophages via microRNA let-7b. *Oncoimmunology.* Taylor & Francis; 2012;1: 687–693. doi:10.4161/onci.19854
414. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* Nature Publishing Group; 2011;12: 861–874. doi:10.1038/nrg3074
415. Lourenco GF, Janitz M, Huang Y, Halliday GM. Long noncoding RNAs in TDP-43 and FUS/TLS-related frontotemporal lobar degeneration (FTLD). *Neurobiol Dis.* 2015;82: 445–454. doi:10.1016/j.nbd.2015.07.011
416. Saldi TK, Ash PE, Wilson G, Gonzales P, Garrido-Lecca A, Roberts CM, et al. TDP-1, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of TDP-43, limits the accumulation of double-stranded RNA. *EMBO J.* EMBO Press; 2014;33: 2947–2966. doi:10.15252/embj.201488740
417. Carpenter S, Aiello D, Atianand MK, Ricci EP, Gandhi P, Hall LL, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science.* American Association for the Advancement of Science; 2013;341: 789–792. doi:10.1126/science.1240925
418. Raponi NA, Qu K, Zhang J, Mikhail M, Laberge R-M, Chang HY. A mammalian pseudogene lncRNA at the interface of inflammation and anti-inflammatory therapeutics. *Elife.* eLife Sciences Publications Limited; 2013;2: e00762. doi:10.7554/eLife.00762
419. Turner M, Galloway A, Vigorito E. Noncoding RNA and its associated proteins as regulatory elements of the immune system. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2014;15: 484–491. doi:10.1038/ni.2887

420. Mink M, Fogelgren B, Olszewski K, Maroy P, Csiszar K. A novel human gene (SARM) at chromosome 17q11 encodes a protein with a SAM motif and structural similarity to Armadillo/beta-catenin that is conserved in mouse, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics*. 2001;74: 234–244. doi:10.1006/geno.2001.6548
421. Kim Y, Zhou P, Qian L, Chuang J-Z, Lee J, Li C, et al. MyD88-5 links mitochondria, microtubules, and JNK3 in neurons and regulates neuronal survival. *J Exp Med*. Rockefeller Univ Press; 2007;204: 2063–2074. doi:10.1084/jem.20070868
422. Bernard-Marissal N, Sunyach C, Marissal T, Raoul C, Pettmann B. Calreticulin levels determine onset of early muscle denervation by fast motoneurons of ALS model mice. *Neurobiol Dis*. 2015;73: 130–136. doi:10.1016/j.nbd.2014.09.009
423. Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, et al. TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol*. Springer-Verlag; 2010;120: 75–84. doi:10.1007/s00401-010-0678-x
424. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim Y-M. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol*. Rockefeller Univ Press; 2007;177: 265–275. doi:10.1083/jcb.200612056
425. Kim Y-M, Brinkmann MM, Paquet M-E, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*. Nature Publishing Group; 2008;452: 234–238. doi:10.1038/nature06726
426. Itoh H, Tatematsu M, Watanabe A, Iwano K, Funami K, Seya T, et al. UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling. Gay N, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2011;6: e28500. doi:10.1371/journal.pone.0028500
427. Shintani Y, Kapoor A, Kaneko M, Smolenski RT, D'Acquisto F, Coppen SR, et al. TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110: 5109–5114. doi:10.1073/pnas.1219243110
428. Shintani Y, Drexler HCA, Kioka H, Terracciano CMN, Coppen SR, Imamura H, et al. Toll-like receptor 9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2. *EMBO Rep*. EMBO Press; 2014;15: 438–445. doi:10.1002/embr.201337945
429. Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res*. 2007.
430. Trang P, Medina PP, Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, et al. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene*. Nature Publishing Group;

2010;29: 1580–1587. doi:10.1038/onc.2009.445

- 431. Zheng G, Ambros V, Li W-H. Inhibiting miRNA in *Caenorhabditis elegans* using a potent and selective antisense reagent. *Silence*. BioMed Central; 2010;1: 9. doi:10.1186/1758-907X-1-9
- 432. Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. *Gene Ther*. Nature Publishing Group; 2011;18: 1104–1110. doi:10.1038/gt.2011.50
- 433. Astakhova K. Toward Non-Enzymatic Ultrasensitive Identification of Single Nucleotide Polymorphisms by Optical Methods. *Chemosensors* 2014, Vol 2, Pages 193-206. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2014;2: 193–206. doi:10.3390/chemosensors2030193
- 434. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2010;327: 198–201. doi:10.1126/science.1178178
- 435. Grimm D, Wang L, Lee JS, Schürmann N, Gu S, Börner K, et al. Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 2010;120: 3106–3119. doi:10.1172/JCI43565
- 436. Søkilde R, Newie I, Persson H, Borg Å, Rovira C. Passenger strand loading in overexpression experiments using microRNA mimics. *RNA Biol*. Taylor & Francis; 2015;12: 787–791. doi:10.1080/15476286.2015.1020270

## **VI. Annexes**



## ANNEXE 1

**ANNEXE 1 : TDP-43 TOXICITY PROCEEDS VIA CALCIUM  
DYSREGULATION AND NECROSIS IN AGING *Caenorhabditis Elegans*  
MOTOR NEURONS**

Dina Aggad<sup>1</sup>, Julie Vérièpe<sup>1,2</sup>, Arnaud Tauffenberger<sup>1,2</sup> and J. Alex Parker<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> CRCHUM, Université de Montréal, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Quebec, Canada

<sup>3</sup> Département de Neurosciences, Université de Montréal, Quebec, Canada

Article publié dans The Journal of Neuroscience, September 3, 2014, 34(36):12093–12103.

Contributions :

D.A. a monté et réalisé les expériences, analysés les données et écrit le manuscrit.

J.V. a monté et réalisé les expériences, et analysé les données.

A.T. a monté les expériences et a contribué à l'obtention de réactifs non publiés et d'outils analytiques.

J.A.P. a monté les expériences, analysé les données et écrit le manuscrit.

## ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a heterogeneous disease with either sporadic or genetic origins characterized by the progressive degeneration of motor neurons. At the cellular level, ALS neurons show protein misfolding and aggregation phenotypes. Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) has recently been shown to be associated with ALS, but the early pathophysiological deficits causing impairment in motor function are unknown. Here we used *Caenorhabditis elegans* expressing mutant TDP-43<sup>A315T</sup> in motor neurons and explored the potential influences of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Using chemical and genetic approaches to manipulate the release of endoplasmic reticulum (ER)  $\text{Ca}^{2+}$  stores, we observed that the reduction of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) rescued age-dependent paralysis and prevented the neurodegeneration of GABAergic motor neurons. Our data implicate elevated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  as a driver of TDP-43-mediated neuronal toxicity. Furthermore, we discovered that neuronal degeneration is independent of the executioner caspase CED-3, but instead requires the activity of the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated calpain protease TRA-3, and the aspartyl protease ASP-4. Finally, chemically blocking protease activity protected against mutant TDP-43<sup>A315T</sup>-associated neuronal toxicity. This work both underscores the potential of the *C. elegans* system to identify key targets for therapeutic intervention and suggests that a focused effort to regulate ER  $\text{Ca}^{2+}$  release and necrosis-like degeneration consequent to neuronal injury may be of clinical importance.

## INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the selective loss of both upper and lower motor neurons in the cortex and spinal cord (Wijesekera and Leigh, 2009). ALS is an age dependent, rapidly progressive disease with life expectancy typically being between 2 and 5 years after onset. Thanks to recent genetic advances, causative mutations for ALS have been discovered in over a dozen genes (Renton et al., 2014), including one encoding transactive response DNA binding protein 43 (TDP-43; Kabashi et al., 2008) among others.

Evidence is mounting that pathways regulating protein degradation may influence ALS pathogenesis (Blokhuys et al., 2013). We previously reported that mutant TDP-43<sup>A315T</sup> proteins expressed in *Caenorhabditis elegans* motor neurons are susceptible to misfolding, leading to insolubility, aggregation (Vaccaro et al., 2012a), and activation of the endoplasmic reticulum (ER) unfolded protein response (UPR<sup>ER</sup>; Vaccaro et al., 2012b, 2013).

Induction of the UPR<sup>ER</sup> by mutant TDP-43 suggests that the capacity of the ER to properly fold proteins may be exceeded, leading to cellular dysfunction and death (Walker and Atkin, 2011).

The ER constitutes a Ca<sup>2+</sup> store whose uptake and release are extensively regulated to maintain cellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis, and disrupted ER function can induce Ca<sup>2+</sup> depletion (Burdakov and Verkhratsky, 2006). Altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis has been investigated as a mechanism to distinguish motor neurons that are vulnerable or resistant to degeneration in ALS (Palecek et al., 1999; Vanselow and Keller, 2000). Indeed, ALS-vulnerable motor neurons in mice display Ca<sup>2+</sup> buffering capacities that are five to six times lower compared with those found in ALS-resistant oculomotor neurons (Vanselow and Keller, 2000), while a more recent study has shown that altered Ca<sup>2+</sup> buffering may be a risk factor for SOD-1 toxicity (von Lewinski et al., 2008).

We investigated the role of cellular Ca<sup>2+</sup> balance in our TDP-43 models to learn more about the mechanisms of Ca<sup>2+</sup>- mediated cellular demise. We report that a null mutation in calreticulin (CRT-1), a central regulator of ER Ca<sup>2+</sup> homeostasis, suppresses both paralysis and the neurodegeneration caused by mutant TDP-43<sup>A315T</sup> in motor neurons. Furthermore,

deletion of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding ER protein calnexin (CNX-1), the ER  $\text{Ca}^{2+}$  release channels UNC-68 (ryanodine receptor), or ITR-1 (inositol 1,4,5 triphosphate receptor) suppressed TDP-43 toxicity. Consistently, pharmacological manipulations modulating ER  $\text{Ca}^{2+}$  release and/or uptake suppressed TDP-43 toxicity. Downstream from perturbed  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, we discovered that mutations in the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated calpain protease TRA-3 and aspartyl protease ASP-4 also suppressed TDP-43 toxicity.

Our findings suggest that the regulation, and possibly release, of ER  $\text{Ca}^{2+}$  stores are required for neurotoxicity of TDP-43 in *C. elegans*. It is generally believed that caspase-driven neuronal apoptosis is an underlying pathogenic mechanism in many late onset neurodegenerative diseases including ALS (Martin, 1999), but the executioner caspase CED-3 is dispensable for neurodegeneration in our TDP-43 model. Instead, the involvement of calpain and aspartyl proteases is more similar to necrosis mediated cell death (Syntichaki et al., 2002). We propose that misfolded mutant TDP-43 increases  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by disrupting ER function and activates calpain proteases, which in turn activates killer aspartyl proteases, leading to cell destruction.

## MATERIALS AND METHODS

*C. elegans* strains and methods.

Standard culturing and genetic methods were used (Stiernagle, 2006). Animals were maintained at 20°C unless otherwise indicated. Unless otherwise stated, the strains used in this study were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis, MN) and include the following: *asp-4(ok2693)*, *ced-3(ok2734)*, *cnx-1(nr2009)*, *cnx-1(nr2010)*, *crt-1(bz30)*, *crt-1(jh101)*, *itr-1(sa73)*, *kbls7 [nhx-2p::rde-1 + rol-6(su1006)]*, *kzls20[pDM#715(hlh-1p::rde-1) + pTG95(sur-5p::nls::GFP)]*, *oxls12 [unc-47p::GFP + lin-15(+)]*, *rde-1(ne219)*, *sid-1(pk3321)*, *tra-3(ok2207)*, *uls69 [pCFJ90(myo-2p::mCherry) + unc-119p::sid-1]*, and *unc-68(e540)*. Genetic crosses generated transgenic/mutant combinations, and the presence of transgenes and mutations was confirmed by PCR, visible markers, sequencing, or a combination thereof.

Transgenic lines expressing mutant TDP-43A315T, wild-type TDP-43 (TDP-43<sup>WT</sup>), *unc-47p::GFP*; TDP-43<sup>A315T</sup>, and *unc-47p::GFP*; TDP-43<sup>WT</sup> were previously described (Vaccaro et al., 2012a) and created as follows: human cDNAs for TDP-43<sup>WT</sup> and TDP-43<sup>A315T</sup> (a gift from Dr. Guy Rouleau, McGill University, Montreal, QC, Canada) were amplified by PCR and cloned into the Gateway vector pDONR221 following the manufacturer's protocol (Invitrogen). Multisite Gateway recombination was performed with the pDONR TDP-43 clones along with clones containing the *unc-47* promoter (a gift from Dr. Erik Jorgensen, University of Utah, Salt Lake City, UT; and Dr. Marc Hammarlund, Yale University, New Haven, CT), the *unc-54* 3' UTR plasmid pCM5.37 (Addgene plasmid 17253; a gift from Dr. Geraldine Seydoux, Johns Hopkins University, Baltimore, MD), and the destination vector pCFJ150 (Addgene plasmid 19329; a gift from Dr. Erik Jorgensen, University of Utah) to create *unc-47p::TDP-43* expression vectors. Transgenic lines were created by microinjection of *unc-119(ed3)* worms, multiple lines were generated, and strains behaving similarly were kept for further analysis. Transgenes were integrated by UV irradiation, and lines were outcrossed to wild-type N2 worms five times before use. Several strains showing comparable phenotypes and transgene expression levels were kept and the strains used in this study include the following: *xqIs132[unc-47p::TDP-43<sup>WT</sup>; unc-119(+)]* and *xqIs133[unc-47p::TDP-43<sup>A315T</sup>; unc-119(+)]*.

#### Pharmacological treatment.

All chemicals were obtained from Sigma- Aldrich. Dantrolene and thapsigargin were dissolved in DMSO and added to agar plate to final concentrations of 10 $\mu$ M and 3 $\mu$ g/ml, respectively. EGTA was dissolved in 1N NaOH and was added to agar plates to a final concentration of 0.5mM. MDL-28170 was dissolved in DMSO and added to agar plate to a final concentration of 20  $\mu$ M.

#### Paralysis assay.

Worms were grown at 20°C on standard Nematode Growth Media (NGM) plates with or without compounds (30 animals/ plate, by triplicates) and scored daily for movement. Animals were scored as paralyzed if they failed to move upon prodding with a worm pick. Failure to move their head to touch and the absence of pharyngeal pumping was scored as

dead. Statistical analysis was performed using Graph- Pad Prism software (log-rank Mantel–Cox test).

#### Neurodegeneration assay.

Worms (*unc-47p::GFP; TDP-43<sup>A315T</sup>* or *unc-47p::GFP; TDP43<sup>WT</sup>*, with or without additional mutations listed above) were grown at 20°C on standard NGM plates with or without compounds. Young adult worms were transferred onto seeded NGM plates (with or without compounds), and were selected at days 1, 5, and 9 of adulthood (100 animals/treatment). Live worms were placed on a 2% agarose pad containing 5 mM levamisole in M9 medium to immobilize the worms. Worms were observed under fluorescence microscopy (Leica 6000 microscope) and scored for gaps or breaks in the processes of GABAergic neurons. The mean and SEM were calculated, and ANOVA with Bonferroni correction were used for statistical analyses.

#### RNA interference experiments.

RNA interference (RNAi)-treated strains were fed *Escherichia coli* (HT115) containing an empty vector (EV) or an RNAi clone corresponding to the gene of interest indicated above. All RNAi clones were from the ORFeome RNAi library (Open Biosystems). RNAi experiments were performed at 20°C. Worms were grown on NGM enriched with 1 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside. All RNAi paralysis tests were performed using a *TDP-43<sup>A315T</sup>; unc-47p::GFP* in conjunction with the appropriate mutation and transgenes for tissue-specific silencing in neurons, intestine, or muscle cells based on strains TU3401, VP303, or NR350, respectively. To minimize developmental effects, L4 worms were grown on plates with RNAi bacteria and assayed for paralysis as adults. Worms were transferred every 2 d.

#### Western blot analysis.

Synchronized populations of worms expressing TDP-43 were grown at 20°C on standard NGM plates with or without compounds (15 plates/treatment). Immunoblot analysis of protein levels was performed on whole-animal extracts prepared by washing animals in M9 medium to remove adherent bacteria. The pellets were placed at -80°C

overnight and homogenized in 1 ml/g RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate) plus 0.1% protease inhibitors (10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml pepstatin A, 10 mg/ml chymostatin; 1:1000). Pellets were sonicated and centrifuged at 16,000 X g. Supernatants were collected and were saved as the total fraction. Protein concentrations were determined by the Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad). Supernatants, 50g/well, were subjected to SDS-PAGE (10%) and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The immunoblotting analyses were performed using the following antibodies: rabbit anti-TDP-43 (1:1000; Proteintech) and mouse anti-actin (1:20,000 for worms; MP Biomedicals). Proteins were visualized using peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Densitometry was performed with Photoshop (Adobe).

## RESULTS

### Genetic manipulation of $[Ca^{2+}]$ suppresses TDP-43 toxicity in motor neurons

CRT-1 is a  $Ca^{2+}$ -binding/storing protein of the ER that serves both as a molecular chaperone and as a central regulator of  $Ca^{2+}$ -homeostasis (Michalak et al., 1999). Worms expressing mutant TDP-43 in their motor neurons show age-dependent motility defects, leading to paralysis and neurodegeneration (Vaccaro et al., 2012a). To investigate the role of  $Ca^{2+}$  balance in TDP-43 neuronal toxicity, we constructed *crt-1(bz30); TDP-43<sup>A315T</sup>* and *crt-1(jh101); TDP-43<sup>A315T</sup>* strains, and scored them for paralysis. We observed a significant reduction in the rate of paralysis for *crt-1(bz30); TDP-43<sup>A315T</sup>* and *crt-1(jh101); TDP-43<sup>A315T</sup>* animals compared with control TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics (Fig. 1A). Focusing on *crt-1(bz30); TDP-43<sup>A315T</sup>*, we also observed a significant rate of motor neuron degeneration compared with control TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics (Fig. 1B).

In the ER, calreticulin works in conjunction with CNX-1 to execute chaperone functions and mediate cellular  $Ca^{2+}$  homeostasis (Krause and Michalak, 1997). Given the functional and structural similarities between the two proteins, we tested whether calnexin, encoded by *cnx-1* in *C. elegans*, also influenced TDP-43 toxicity. We observed that



introduction of the loss of function mutations *cnx-1(nr2009)* or *cnx-1(nr2010)* into mutant TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics led to a significant decrease in paralysis compared with control TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics (Fig. 1A). Focusing on *cnx-1(nr2010); TDP-43<sup>A315T</sup>*, we also observed a significant decrease of motor neuron degeneration compared with control TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics (Fig. 1B).

To complete the genetic investigation of cellular Ca<sup>2+</sup> balance, we tested the following two other genes involved in ER regulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: the ER Ca<sup>2+</sup> release channel inositol triphosphate receptor channel InsP3R, encoded by *itr-1* (Dal Santo et al., 1999), and the ER Ca<sup>2+</sup> release channel ryanodine receptor channel RyR, encoded by *unc-68* (Maryon et al., 1996). We then investigated the effects of mutations in the InsP3R and RyR genes on TDP-43<sup>A315T</sup>-mediated paralysis and motor neuron degeneration. Similar to the disruption of calnexin and calreticulin function, *itr-1(sa73); TDP-43<sup>A315T</sup>* and *unc-68(e540); TDP-43<sup>A315T</sup>* strains displayed significantly reduced paralysis and motor neuron degeneration phenotypes compared with TDP-43<sup>A315T</sup> controls (Fig. 1C,D). To confirm that the suppression of TDP-43<sup>A315T</sup> neuronal toxicity was not due to transgene effects, we quantified the level of TDP-43 protein expression by immunoblotting and observed no difference in protein levels for TDP-43 in combination with any of the mutations (Fig. 1E).

### **Pharmacological modulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> regulates TDP-43<sup>A315T</sup> toxicity in motor neurons**

To confirm that altering [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> levels in turn regulates TDP-43 toxicity, we turned to a complementary approach by using chemical reagents to manipulate ER Ca<sup>2+</sup> release and/or uptake. We first treated TDP-43<sup>A315T</sup> mutants with EGTA, a Ca<sup>2+</sup>-specific chelator, and observed a clear reduction in the rate of paralysis and neurodegeneration compared with untreated TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics (Fig. 2A,B). Additionally, EGTA did not further suppress paralysis and neurodegeneration in *crt-1(bz30); TDP-43<sup>A315T</sup>* or *itr-1(sa73); TDP-43<sup>A315T</sup>* strains (Fig. 2A,B), suggesting that *crt-1*, *itr-1*, and EGTA use a common mechanism to reduce TDP-43 toxicity, namely reduced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

We next tested whether Ca<sup>2+</sup> derived from ER stores might contribute to the progressive paralysis caused by mutant TDP-43. We treated TDP-43<sup>A315T</sup> mutants with dantrolene, a reagent that specifically inhibits Ca<sup>2+</sup> release from ER stores (Song et al.,

1993). In dantrolene-treated animals, paralysis and neurodegeneration were markedly reduced consistent with the hypothesis that ER  $\text{Ca}^{2+}$  stores contribute to TDP-43 neuronal toxicity (Fig. 2C,D). Dantrolene treatment did not further suppress paralysis and neurodegeneration phenotypes caused by TDP-43<sup>A315T</sup> in *crt-1(bz30)* and *itr-1(sa73)* mutants, suggesting a shared mechanism of action (Fig. 2C,D). The suppression of TDP-43 toxicity by EGTA and dantrolene were not due to reduced transgene expression since similar levels of TDP-43 protein expression were detected by immunoblotting in treated and untreated TDP-43 transgenics (Fig. 2E).

We previously reported that worms expressing mutant TDP- 43, but not wild-type TDP-43, show elevated ER and oxidative stress (Vaccaro et al., 2013).  $\text{Ca}^{2+}$  release and uptake is essential for normal cellular function, and we hypothesized that chemically manipulating  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  may only be beneficial to neurons expressing mutant TDP-43 if disrupted  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis is indeed an underlying mechanism of mutant TDP-43 toxicity. To explore this possibility, we tested transgenics expressing TDP-43<sup>WT</sup> with EGTA or dantrolene, and observed that exposure to either compound greatly enhanced paralysis and neurodegeneration (Fig. 3). Thus, chemically manipulating  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  is beneficial only to neurons expressing mutant TDP-43 proteins.

### **Thapsigargin-induced ER $\text{Ca}^{2+}$ release restores TDP-43<sup>A315T</sup> dependent cell death in the absence of calreticulin**

We next explored whether forced ER  $\text{Ca}^{2+}$  release might overcome the *crt-1*-induced block on TDP-43-mediated paralysis and neurodegeneration. Here, we sought to reverse *crt-1*-dependent suppression of TDP-43 neuronal toxicity by driving release of the remaining ER  $\text{Ca}^{2+}$  stores in *TDP-43<sup>A315T</sup>; crt-1(bz30)* animals. We treated *TDP-43<sup>A315T</sup>; crt-1(bz30)* animals, which are fully suppressed for paralysis and neurodegeneration, with thapsigargin, a compound that inhibits the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) ER  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake pump and induces the release of ER  $\text{Ca}^{2+}$  via the InsP3 receptor channel (Takemura et al., 1989). We found that thapsigargin treatment significantly restored paralysis and neurodegeneration in *TDP- 43<sup>A315T</sup>; crt-1(bz30)* mutants compared with chemically untreated controls (Fig. 4A,B). As a positive control, we exposed transgenics expressing TDP-43<sup>WT</sup> to thapsigargin, and we observed the enhancement of

paralysis and neurodegeneration phenotypes (Fig. 4A,B), suggesting that increased  $[Ca^{2+}]_i$  induces cellular damage in *C. elegans*. Finally, using immunoblotting we confirmed that treatment with thapsigargin did not affect the expression of TDP-43 transgenes (Fig. 4C). In summary, these data suggest that the elevation of  $[Ca^{2+}]_i$  itself may be cytotoxic in nematode motor neurons, supporting a model in which a critical rise in  $[Ca^{2+}]_i$  is a causative factor in neurotoxicity, and that CRT-1 is not required for thapsigargin-induced cell death.

### **Calpain and aspartyl proteases are required for neurodegeneration in a *C. elegans* ALS model**

Caspase-dependent apoptosis is a major mechanism promoting cell death in neurodegenerative diseases (Fuchs and Steller, 2011). To determine whether apoptosis was involved in TDP-43 toxicity, we disrupted the main executioner protease, caspase CED-3, which mediates programmed cell death in *C. elegans* (Ellis and Horvitz, 1986). We observed that *ced-3* was not required for paralysis or degenerative phenotypes induced by mutant TDP-43<sup>A315T</sup> in motor neurons (Fig. 5A,B). Thus, having shown that genetic and pharmacological manipulation of  $[Ca^{2+}]_i$  suppresses neurotoxic effects of TDP-43<sup>A315T</sup> in motor neurons, and based on the “calpain– cathepsin” hypothesis described previously (Yamashima et al., 1998), we investigated aspartyl and calpain protease function in paralysis and neurodegeneration. There are 17 genes with similarity to calpain, 7 of which show significant identity to mammalian calpains (Syntichaki et al., 2002), and 7 aspartyl protease genes encoded in the *C. elegans* genome (Tcherepanova et al., 2000). Based on previous work linking some of these genes to neurodegeneration in *C. elegans* (Syntichaki et al., 2002), as well as the availability of viable loss-of-function mutant strains, we focused on the  $Ca^{2+}$ -regulated calpain protease TRA-3 and the aspartyl protease ASP-4. Furthermore, *asp-4* has previously been identified as a modifier of  $\alpha$ -synuclein toxicity in *C. elegans* (Qiao et al., 2008). Using null mutants for *tra-3* and *asp-4*, we scored for paralysis and neurodegeneration in strains expressing TDP-43<sup>A315T</sup>. We observed a significant reduction in the rate of paralysis and the progressive degeneration of motor neurons for *TDP-43<sup>A315T</sup>; tra-3(ok2207)* or *TDP-43<sup>A315T</sup>; asp-4(ok2693)* animals compared with control TDP-43<sup>A315T</sup> strains (Fig. 5A,B). To confirm that these calpain and aspartyl proteases acted downstream of elevated  $[Ca^{2+}]_i$  to regulate mutant TDP-43 toxicity, we treated *TDP-43<sup>A315T</sup>; tra-*

*3(ok2207)* and *TDP-43<sup>A315T</sup>; asp-4(ok2693)* strains with thapsigargin. We observed that thapsigargin treatment failed to restore *TDP-43<sup>A315T</sup>*-induced paralysis and neurodegeneration when the calpain or aspartyl proteases were absent (Fig. 5C,D). These data suggest that *tra-3* and *asp-4* are essential for calcium-mediated neurotoxicity associated with mutant *TDP-43*, and that these proteases may be a terminal effector of neurodegeneration. Furthermore, *TDP-43* transgene expression was not affected by mutations in *ced-3*, *tra-3*, or *asp-4* (Fig. 5E). We next wanted to determine whether the calpain–aspartyl protease pathway could be a target for small-molecule intervention against *TDP-43* toxicity. Z-Val-Phe-CHO (MDL-28170) is a calpain inhibitor previously shown to suppress necrosis in *C. elegans* (Syntichaki et al., 2002). We observed a significant reduction of *TDP-43<sup>A315T</sup>*-mediated paralysis in worms treated with MDL-28170 (Fig. 5F). These data suggest that calpain and aspartyl proteases maybe targeted for preventing neurodegeneration associated with mutant ALS proteins.

### **Cell-autonomous suppression of *TDP-43* toxicity by *tra-3* and *asp-4* in motor neurons**

We wondered whether the regulation of *TDP-43* toxicity was specific to *tra-3* and *asp-4*, or involved additional calpain and aspartyl proteases. Using RNAi, we conducted a blind screen of five calpain (*clp-1*, *clp-2*, *clp-4*, *clp-7*, and *tra-3*) and seven aspartyl (*asp-1*, *asp-3*, *asp-4*, *asp-6*, *asp-7*, *asp-10*, and *asp-13*) protease genes against *TDP-43<sup>A315T</sup>* transgenics engineered for RNAi sensitivity only within the nervous system (Calixto et al., 2010). We observed that RNAi against only *tra-3* or *asp-4* significantly suppressed the paralysis phenotype of *TDP-43<sup>A315T</sup>* transgenics (Fig. 6A,B). In conjunction with our experiments using null mutants, our RNAi experiments suggest that the regulation of *TDP-43<sup>A315T</sup>* toxicity is specific to *tra-3* and *asp-4*. We wondered whether the effects of *tra-3* and *asp-4* in mediating *TDP-43<sup>A315T</sup>* motor defects were cell autonomous or cell nonautonomous. We conducted *tra-3* or *asp-4* RNAi experiments in *TDP-43<sup>A315T</sup>* transgenics sensitized to RNAi only within intestinal cells or body wall muscle cells. We observed no significant reduction of paralysis by *tra-3* or *asp-4* RNAi targeted to intestinal or body wall muscle cells (Fig. 6C,D). These data suggest that motor defects and degenerative phenotypes caused by *TDP-43<sup>A315T</sup>* require the activity of *tra-3* and *asp-4* in the nervous system, and are not likely to be influenced by protease activity in other tissues.

Unfortunately, we could not extend this analysis to  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis genes since *crt-1* and *itr-1* RNAi were ineffective in our assays.

### **$\text{Ca}^{2+}$ homeostasis and protease genes do not suppress TDP-43<sup>WT</sup> motor defects**

Since our primary assay to identify neuroprotective agents depends on a behavioral assay to detect improved motility of TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics, there is the possibility that we may have identified mutants that nonspecifically augment motility phenotypes. To rule this out, we turned to our TDP-43<sup>WT</sup> strains that show limited toxicity, with paralysis phenotypes comparable to the expression of GFP alone (Vaccaro et al., 2012a). We crossed *itr-1(sa73)*, *unc-68(e540)*, *crt-1(bz30)*, *cnx-1(nr2010)*, *tra-3(ok2207)*, or *asp-4(ok2693)* mutations into the TDP-43<sup>WT</sup> strain, but none of the mutations suppressed the paralysis phenotype caused by TDP-43<sup>WT</sup> (Fig. 7). However, *TDP-43<sup>WT</sup>; unc-68(e540)* animals had a higher rate of paralysis compared with TDP-43<sup>WT</sup> controls ( $p < 0.05$ ), suggesting that a general impairment of UNC-68 function may negatively impact the neuronal function and motility observed in TDP-43<sup>WT</sup> worms. Thus, we conclude that neuroprotective effects of these mutants against TDP-43<sup>A315T</sup> toxicity are not due to a general improvement of motor function.

## **DISCUSSION**

### **$\text{Ca}^{2+}$ homeostasis and ALS**

$\text{Ca}^{2+}$  is an intracellular signaling molecule that regulates many mechanisms in the nervous system (Nikoletopoulou and Tavernarakis, 2012). Cells maintain a tightly controlled resting cytosolic free calcium concentration of 100 nM by extruding excess  $\text{Ca}^{2+}$  by pumps and exchangers, and by compartmentalizing  $\text{Ca}^{2+}$ . The ER is involved in many critical processes, including being a specialized  $\text{Ca}^{2+}$ -storing organelle (100–800 $\mu\text{M}$  range). The ER is closely involved in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  flow within cells and is found in all neurons, occupying cell bodies, and extending toward axons, dendrites, and dendritic spines. In the context of ALS, evidence is mounting that the capacity of the cellular

machinery of the ER to properly fold proteins is exceeded (Hetz and Mollereau, 2014), leading cells to react with the UPR<sup>ER</sup> and that a perturbation of the ER function can induce Ca<sup>2+</sup> depletion. Studies investigating Ca<sup>2+</sup> homeostasis in motor neurons have shown that ALS-vulnerable motor neurons in mice display low endogenous Ca<sup>2+</sup> buffering capacities (Lips and Keller, 1998; Palecek et al., 1999). We hypothesized that dysregulated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, possibly from the release of ER Ca<sup>2+</sup> stores, may contribute to mutant TDP-43 neuronal toxicity. We tested for potential influences of Ca<sup>2+</sup> in mutant TDP-43<sup>A315T</sup>-induced degeneration in the following two ways: with genetic mutations that alter release of ER Ca<sup>2+</sup> stores; and by using chemical reagents to manipulate ER Ca<sup>2+</sup> release (Fig. 8). We found that null mutations in *crt-1*, a molecular chaperone that plays a critical and complex role in cellular calcium homeostasis as a major site for stored Ca<sup>2+</sup> (Michalak et al., 1999), suppressed both paralysis and neurodegeneration induced by mutant TDP-43. Dysregulation of the ER-resident Ca<sup>2+</sup> binding protein calreticulin may directly contribute to motor neuron death in ALS models (Bernard-Marissal et al., 2012). Our data showing that calreticulin contributes to neurodegeneration is somewhat at odds with findings for an SOD-1 model showing that reduced calreticulin levels activate the FAS/CD95 pathway to trigger cell death (Bernard-Marissal et al., 2012). However, no clear ortholog of FAS/CD95 exists in the *C. elegans* genome, suggesting that the role of calreticulin in mediating TDP-43 neuronal toxicity in our study may follow different cellular mechanisms. Alternatively, the mechanisms governing the degradation of SOD1 proteins may be distinct from TDP-43 (Mulligan and Chakrabartty, 2013).

However, ER stress has emerged as a mechanism in ALS (Matus et al., 2013; Tadic et al., 2014), and has been linked to the motor neuron vulnerability observed in SOD-1 mouse models (Nishitoh et al., 2008; Saxena et al., 2009), but it remains to be seen whether the ER is a site of action for other ALS mouse models. Furthermore, many aspects of the genetic signaling pathways controlling ER stress response were discovered in *C. elegans* and are conserved in mammalian systems (Mori, 2009). Encouragingly, we previously linked the ER stress response to TDP-43 toxicity (Vaccaro et al., 2013), and identified a number of small molecules that reduce neurodegeneration in *C. elegans* and zebrafish TDP-43 motor neuron models. Further insights into the induction of the ER stress response and neurodegeneration come from a recent report using a *C. elegans* model of SOD1 neuronal

toxicity (Thompson et al., 2014). Linking the model organism studies to mammals are the ER stress-protective compounds salubrinal (Saxena et al., 2009) and guanabenz (Jiang et al., 2014), both of which show neuroprotective activity in mouse SOD-1 models. Thus, work from *C. elegans* models may be predictive for mechanisms of motor neuron degeneration in mammalian systems.

Because luminal calreticulin works in conjunction with calnexin to effectuate chaperone functions and mediate cellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (Krause and Michalak, 1997), we also disrupted calnexin function using loss-of-function mutations and confirmed the suppression of TDP-43 neuronal toxicity. It is known that  $\text{Ca}^{2+}$  is released from ER stores into the cytoplasm via the InsP3R and the RyR  $\text{Ca}^{2+}$  channels. We blocked the RyR function by using a null mutation in *unc-68* or by treatment with dantrolene, a reagent that specifically inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  release from ER stores (Song et al., 1993), and InsP3R by using a null mutation in *itr-1*, and we showed the same suppression of TDP-43 toxicity. Thus, our data extend upon and are consistent with recent work showing that inositol triphosphate receptors regulate neurotoxicity in *Drosophila* and cell culture TDP-43 models (Kim et al., 2012). Further highlighting the role of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, treatment of TDP-43<sup>A315T</sup> mutants with EGTA, a  $\text{Ca}^{2+}$  specific chelator, produced a clear reduction of paralysis and neurodegeneration phenotypes. Importantly, the fact that neither dantrolene nor EGTA enhanced TDP-43 toxicity in *TDP-43<sup>A315T</sup>; crt-1* or *TDP-43<sup>A315T</sup>; itr-1* double mutants suggests that the inappropriate release of  $\text{Ca}^{2+}$  from ER stores may be a common mechanism of TDP-43-mediated neuronal toxicity. Conversely, thapsigargin-induced ER  $\text{Ca}^{2+}$  release, by activating the InsP3R function and blocking the  $\text{Ca}^{2+}$  return to the ER from the cytoplasm via the SERCA  $\text{Ca}^{2+}$  pump, can restore TDP-43<sup>A315T</sup> induced cell death in the absence of calreticulin, indicating that  $\text{Ca}^{2+}$  release and uptake are essential for TDP-43<sup>A315T</sup> neuronal toxicity, and can in fact also enhance the toxicity of worms expressing TDP-43<sup>WT</sup> in motor neurons.

### **The role of endogenous TDP-1/TDP-43 in neurodegeneration**

Our group (Vaccaro et al., 2012b), plus another research team (Zhang et al., 2012), previously reported that endogenous TDP-1 (*C. elegans* ortholog of TDP-43) is required for toxicity caused by the transgenic expression of mutant TDP-43 in the *C. elegans* nervous

system. Additionally, we also showed that TDP-1/TDP-43 is required for the toxicity of mutant polyglutamine proteins in *C. elegans* and mammalian cell culture models of Huntington's disease (Tauffenberger et al., 2013). These findings suggest that wild-type TDP-1/TDP-43 may actively contribute to neurodegeneration beyond ALS. Our previous work also showed that *tdp-1* is ubiquitously expressed, and is mainly a nuclear protein. Under stress conditions, including ER stress, TDP-1 expression is increased, and this chronic, elevated expression is cytotoxic, leading to decreased lifespan in worms (Vaccaro et al., 2012b). These observations are consistent with the function of TDP-43 as a stress-inducible protein, as is seen in many systems (Janssens and Van Broeckhoven, 2013). Another conserved phenotype of TDP-43 is its cytotoxicity when overexpressed, suggesting that its expression levels are tightly regulated (Buratti and Baralle, 2011). A caveat of our data interpretation in this current study is that a role for TDP-1 in the necrosis-like degeneration of TDP-43<sup>A315T</sup> motor neurons was not examined. Part of the cascade of molecular events described here leading to neurodegeneration may involve endogenous TDP-1. The cytotoxicity of TDP-1 itself may depend on Ca<sup>2+</sup> homeostasis and/or protease genes. Additionally, since TDP-1 is a DNA/RNA binding protein, another possibility is that TDP-1 may regulate the expression of Ca<sup>2+</sup> and protease genes under stress conditions, including for proteotoxicity and ER stress. Future studies will explore the contribution of TDP-1 to these molecular mechanisms.

### **Necroptosis as a key mechanism of neurodegeneration in ALS**

The perturbation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> homeostasis has been implicated in necrotic cell death both in mammals and in *C. elegans* (Sattler and Tymianski, 2000; Xu et al., 2001), but the mechanism by which Ca<sup>2+</sup> triggers cellular demise remains unclear; so, we investigated relevant signaling pathways based upon the "calpain– cathepsin hypothesis." In 1998, Yamashima et al. formulated the calpain– cathepsin hypothesis, according to which Ca<sup>2+</sup>-activated cysteine proteases compromise the integrity of the lysosome and cause leakage of acidic hydrolases (Yamashima et al., 1998). We tested the requirement for calpain and aspartyl protease activity in neurodegeneration inflicted by the expression of TDP-43<sup>A315T</sup> in GABAergic motor neurons, and showed that null mutations in the calcium-regulated *tra-3* calpain protease and aspartyl protease *asp-4* suppress both paralysis and



neurodegeneration. Interestingly, TDP-43<sup>A315T</sup> toxicity was unaffected by a null mutation in the cysteine–aspartate protease CED-3, a protein central to apoptosis in *C. elegans*, and in agreement with previous studies of TDP-43 toxicity in *C. elegans* (Liachko et al., 2010). Thus, in terms of genetic signaling pathways the neuronal toxicity caused by TDP-43<sup>A315T</sup> in *C. elegans* more closely resembles necrosis than classic apoptosis (Troulinaki and Tavernarakis, 2012).

Recent work has suggested that motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS occurs through necroptosis (Re et al., 2014), a form of programmed necrosis that does not require caspases (Ofengeim and Yuan, 2013). Our work is in agreement with this notion as inactivation of a *C. elegans* key executioner caspase, *ced-3*, had no effect on motor neuron dysfunction in our TDP-43 models. Key molecules regulating necroptosis in ALS models include the receptor-interacting serine/threonine protein kinase 1 and mixed-lineage kinase domain-like, but whether orthologs of these proteins regulate TDP-43 toxicity in our *C. elegans* ALS models requires further investigation. Importantly, work from *C. elegans* detailing programmed necrosis may shed light on mechanisms relevant to neurodegeneration in mammalian settings and perhaps specifically ALS.

Abnormal Ca<sup>2+</sup> signaling has been linked to multiple neurological disorders, but the challenge remains in identifying disease-specific mechanisms (Bezprozvanny, 2009). We propose that the chronic stress induced by misfolded mutant TDP-43 proteins induces the inappropriate release of Ca<sup>2+</sup> from ER stores into the cytoplasm is a trigger for subsequent neurodegeneration (Fig. 8). Disrupted Ca<sup>2+</sup> homeostasis may have multiple downstream, effector mechanisms promoting neuronal dysfunction and cell death, including the inappropriate activation of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases identified here, disrupting mitochondrial activity (Tradewell et al., 2011; Parone et al., 2013), or altered Ca<sup>2+</sup> signaling at the neuromuscular junction (Armstrong and Drapeau, 2013). Thus, restoration of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in ALS motor neurons and/or limiting programmed necrosis may be pursued as potential therapeutic interventions.

## REFERENCES

- Armstrong GA, Drapeau P (2013) Calcium channel agonists protect against neuromuscular dysfunction in a genetic model of TDP-43 mutation in ALS. *J Neurosci* 33:1741–1752.
- Bernard-Marissal N, Moumen A, Sunyach C, Pellegrino C, Dudley K, Henderson CE, Raoul C, Pettmann B (2012) Reduced calreticulin levels link endoplasmic reticulum stress and Fas-triggered cell death in motoneurons vulnerable to ALS. *J Neurosci* 32:4901– 4912.
- Bezprozvanny I (2009) Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med* 15:89 –100.
- Blokhuis AM, Groen EJ, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ (2013) Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 125:777–794.
- Buratti E, Baralle FE (2011) TDP-43: new aspects of autoregulation mechanisms in RNA binding proteins and their connection with human disease. *FEBS J* 278:3530 –3538.
- Burdakov D, Verkhratsky A (2006) Biophysical re-equilibration of Ca<sup>2+</sup> fluxes as a simple biologically plausible explanation for complex intracellular Ca<sup>2+</sup> release patterns. *FEBS Lett* 580:463– 468.
- Calixto A, Chelur D, Topalidou I, Chen X, Chalfie M (2010) Enhanced neuronal RNAi in *C. elegans* using SID-1. *Nat Methods* 7:554 –559.
- Dal Santo P, Logan MA, Chisholm AD, Jorgensen EM (1999) The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*. *Cell* 98:757–767.
- Ellis HM, Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44:817– 829.
- Fuchs Y, Steller H (2011) Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147:742–758.
- Hetz C, Mollereau B (2014) Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 15:233–249.
- Janssens J, Van Broeckhoven C (2013) Pathological mechanisms underlying TDP-43 driven neurodegeneration in FTL-ALS spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 22:R77–R87.
- Jiang HW, Ren M, Jiang HZ, Wang J, Zhang J, Yin X, Wang SY, Qi Y, Wang XD, Feng HL (2014)

- Guanabenz delays the onset of disease symptoms, extends lifespan, improves motor performance and attenuates motor neuron loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 277C:132–138.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA (2008) TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40:572–574.
- Kim SH, Zhan L, Hanson KA, Tibbetts RS (2012) High-content RNAi screening identifies the Type 1 inositol triphosphate receptor as a modifier of TDP-43 localization and neurotoxicity. *Hum Mol Genet* 21:4845– 4856.
- Krause KH, Michalak M (1997) Calreticulin. *Cell* 88:439–443.
- Liachko NF, Guthrie CR, Kraemer BC (2010) Phosphorylation promotes neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of TDP-43 proteinopathy. *J Neurosci* 30:16208 –16219.
- Lips MB, Keller BU (1998) Endogenous calcium buffering in motoneurons of the nucleus hypoglossus from mouse. *J Physiol* 511:105–117.
- Martin JB (1999) Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med* 340:1970 –1980.
- Maryon EB, Coronado R, Anderson P (1996) *unc-68* encodes a ryanodine receptor involved in regulating *C. elegans* body-wall muscle contraction. *J Cell Biol* 134:885– 893.
- Matus S, Valenzuela V, Medinas DB, Hetz C (2013) ER dysfunction and protein folding stress in ALS. *Int J Cell Biol* 2013:674751.
- Michalak M, Corbett EF, Mesaali N, Nakamura K, Opas M (1999) Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* 344:281–292.
- Mori K (2009) Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J Biochem* 146:743–750.
- Mulligan VK, Chakrabartty A (2013) Protein misfolding in the late-onset neurodegenerative diseases: common themes and the unique case of amyotrophic lateral sclerosis. *Proteins* 81:1285–1303.
- Nikoletopoulou V, Tavernarakis N (2012) Calcium homeostasis in aging neurons. *Front Genet* 3:200.
- Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T,

- Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H (2008) ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* 22:1451–1464.
- Ofengeim D, Yuan J (2013) Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:727–736.
- Palecek J, Lips MB, Keller BU (1999) Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *J Physiol* 520:485–502.
- Parone PA, Da Cruz S, Han JS, McAlonis-Downes M, Vetto AP, Lee SK, Tseng E, Cleveland DW (2013) Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 33:4657–4671.
- Qiao L, Hamamichi S, Caldwell KA, Caldwell GA, Yacoubian TA, Wilson S, Xie ZL, Speake LD, Parks R, Crabtree D, Liang Q, Crimmins S, Schneider L, Uchiyama Y, Iwatsubo T, Zhou Y, Peng L, Lu Y, Standaert DG, Walls KC, et al. (2008) Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alphasynuclein aggregation and toxicity. *Mol Brain* 1:17.
- Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, Ikiz B, Hoffmann L, Koolen M, Nagata T, Papadimitriou D, Nagy P, Mitsumoto H, Kariya S, Wichterle H, Henderson CE, Przedborski S (2014) Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron* 81:1001–1008.
- Renton AE, Chio` A, Traynor BJ (2014) State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 17:17–23.
- Sattler R, Tymianski M (2000) Molecular mechanisms of calciumdependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78:3–13.
- Saxena S, Cabuy E, Caroni P (2009) A role for motoneuron subtype selective-ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 12:627–636.
- Song SK, Karl IE, Ackerman JJ, Hotchkiss RS (1993) Increased intracellular  $Ca^{2+}$ : a critical link in the pathophysiology of sepsis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3933–3937.
- Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*:1–11.
- Syntichaki P, Xu K, Driscoll M, Tavernarakis N (2002) Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* 419:939–944.
- Tadic V, Prell T, Lautenschlaeger J, Grosskreutz J (2014) The ER mitochondria calcium cycle

and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* 8:147.

Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW Jr (1989) Activation of calcium entry by the

tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* 264:12266–12271.

Tauffenberger A, Chitramuthu BP, Bateman A, Bennett HP, Parker JA (2013) Reduction of polyglutamine toxicity by TDP-43, FUS and progranulin in Huntington's disease models. *Hum Mol Genet* 22:782–794.

Tcherepanova I, Bhattacharyya L, Rubin CS, Freedman JH (2000) Aspartic proteases from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and developmental and cell-specific expression of asp-1. *J Biol Chem* 275:26359 –26369.

Thompson ML, Chen P, Yan X, Kim H, Borom AR, Roberts NB, Caldwell KA, Caldwell GA (2014) TorsinA rescues ER-associated stress and locomotive defects in *C. elegans* models of ALS. *Dis Model Mech* 7:233–243.

Tradewell ML, Cooper LA, Minotti S, Durham HD (2011) Calcium dysregulation, mitochondrial pathology and protein aggregation in a culture model of amyotrophic lateral sclerosis: mechanistic relationship and differential sensitivity to intervention. *Neurobiol Dis* 42:265–275.

Troulinaki K, Tavernarakis N (2012) Endocytosis and intracellular trafficking contribute to necrotic neurodegeneration in *C. elegans*. *EMBO J* 31:654–666.

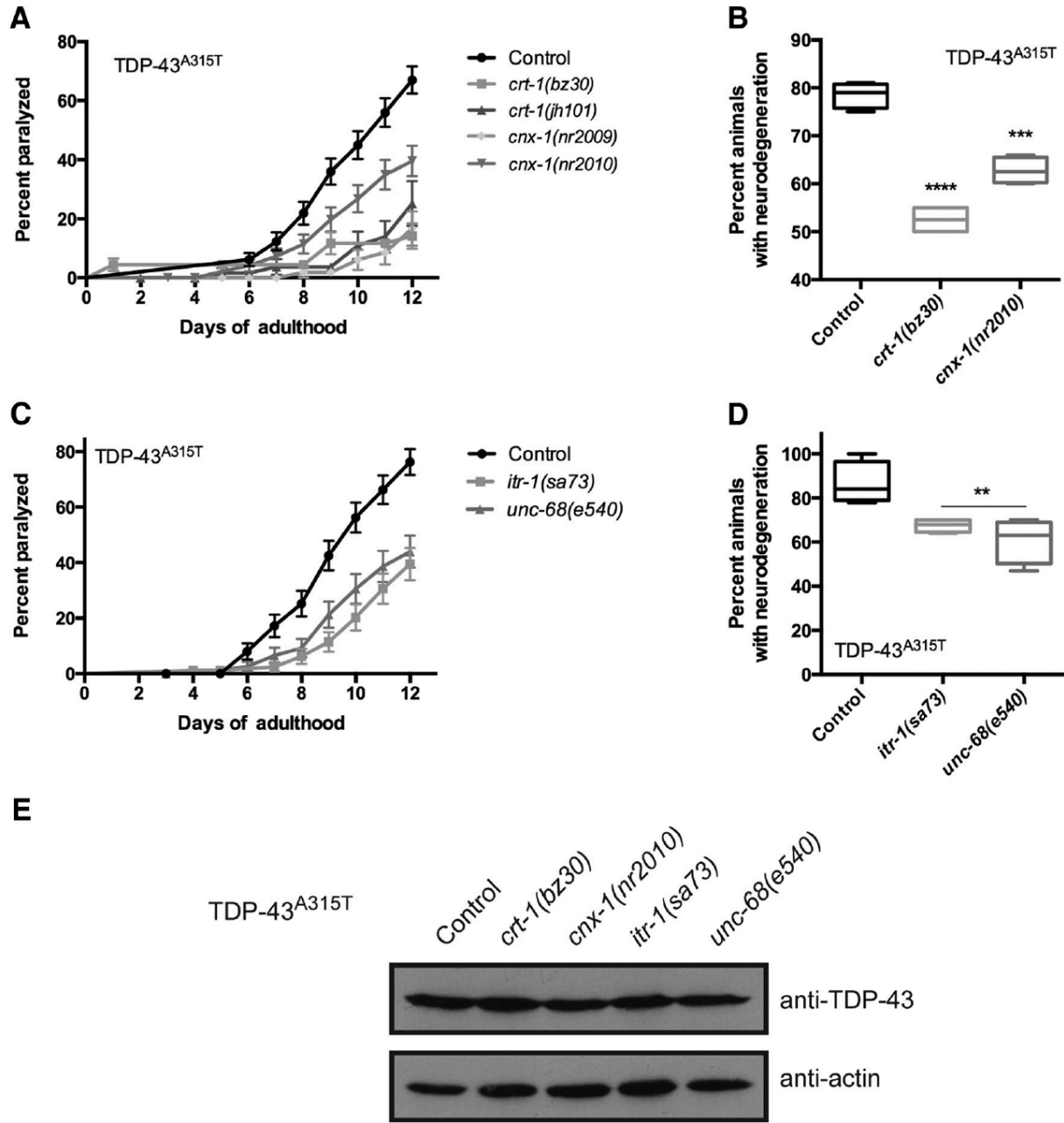
Vaccaro A, Tauffenberger A, Aggad D, Rouleau G, Drapeau P, Parker JA (2012a) Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in *C. elegans*. *PLoS One* 7:e31321.

Vaccaro A, Tauffenberger A, Ash PE, Carlomagno Y, Petrucelli L, Parker JA (2012b) TDP-1/TDP-43 regulates stress signaling and age-dependent proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 8:e1002806.

Vaccaro A, Patten SA, Aggad D, Julien C, Maios C, Kabashi E, Drapeau P, Parker JA (2013) Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity in vivo. *Neurobiol Dis* 55:64 –75.

- Vanselow BK, Keller BU (2000) Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *J Physiol* 525:433–445.
- von Lewinski F, Fuchs J, Vanselow BK, Keller BU (2008) Low  $\text{Ca}^{2+}$  buffering in hypoglossal motoneurons of mutant SOD1 (G93A) mice. *Neurosci Lett* 445:224–228.
- Walker AK, Atkin JD (2011) Stress signaling from the endoplasmic reticulum: a central player in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *IUBMB Life* 63:754–763.
- Wijesekera LC, Leigh PN (2009) Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 4:3.
- Xu K, Tavernarakis N, Driscoll M (2001) Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of  $\text{Ca}^{2+}$  release from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 31:957–971.
- Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, Kominami E (1998) Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on ‘calpain-cathepsin hypothesis’. *Eur J Neurosci* 10:1723–1733.
- Zhang T, Hwang HY, Hao H, Talbot C Jr, Wang J (2012) *Caenorhabditis elegans* RNA-processing protein TDP-1 regulates protein homeostasis and life span. *J Biol Chem* 287:8371–8382.

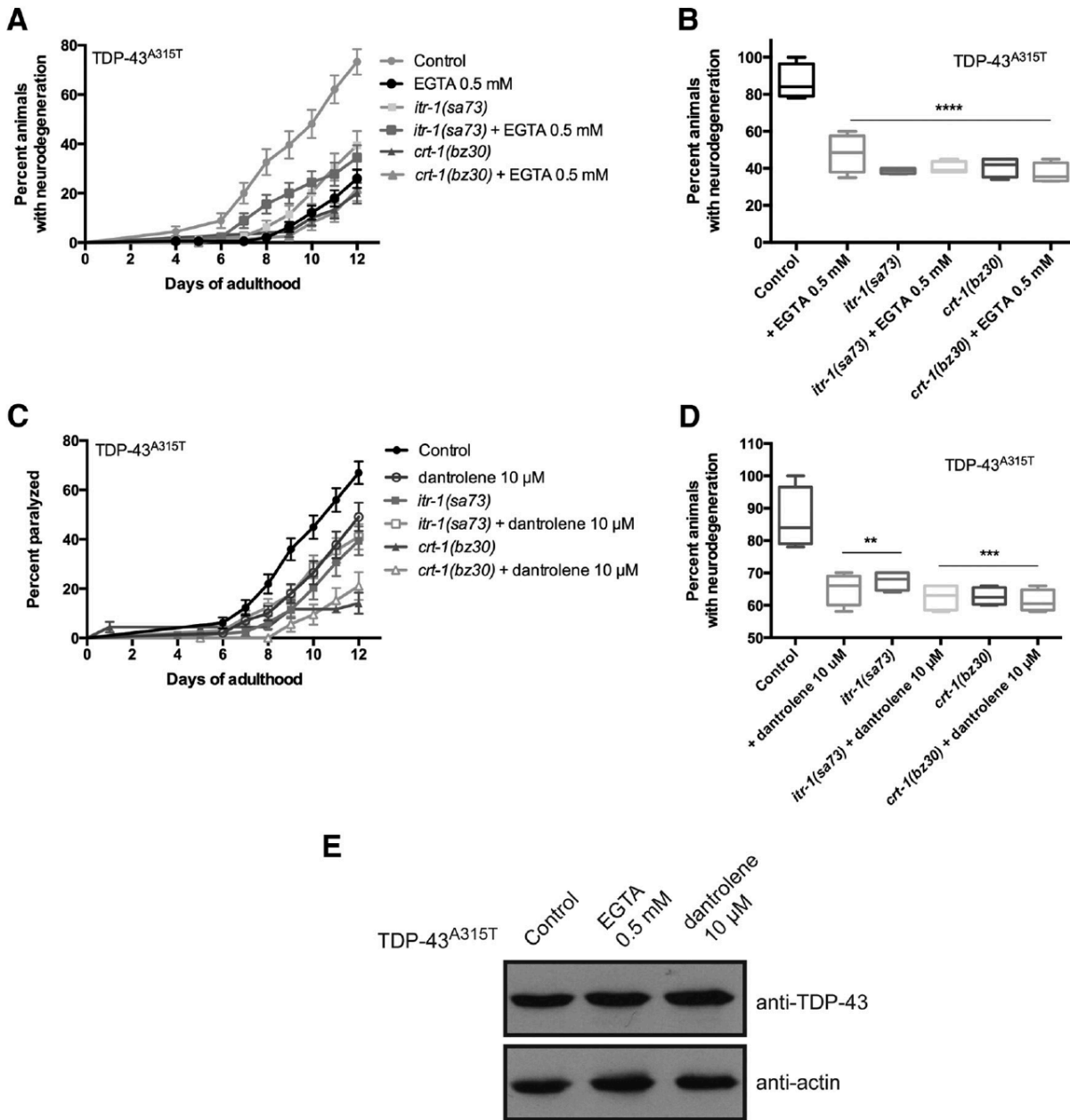
## FIGURES



**Figure 1. Genes regulating ER calcium release promote TDP-43 neuronal toxicity.** A, Null mutations in *cnx-1* or *crt-1* suppress age-dependent paralysis caused by TDP-43<sup>A315T</sup> compared with transgenic TDP-43<sup>A315T</sup> controls.  $p < 0.0001$  for TDP-43<sup>A315T</sup>; *cnx-1(nr2009)* versus TDP-43<sup>A315T</sup>;  $p < 0.0002$  for TDP-43<sup>A315T</sup>; *cnx-1(nr2010)* versus TDP-43<sup>A315T</sup>;  $p < 0.0001$  for TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)* versus TDP-43<sup>A315T</sup>;  $p < 0.0001$  for TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(jh101)* versus TDP-43<sup>A315T</sup>. TDP-43<sup>A315T</sup>,  $n = 114$ ; TDP-43<sup>A315T</sup>; *cnx-1(nr2009)*,  $n = 76$ ; TDP-

43<sup>A315T</sup>; *cnx-1(nr2010)*, n=98; TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)*, n=90; and TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(jh101)*, n=63. B, Mutations in *cnx-1* or *crt-1* reduce age-dependent neurodegeneration in TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics compared with TDP-43<sup>A315T</sup> control animals. \*\*\*p<0.001 versus TDP-43<sup>A315T</sup> at day 9; \*\*\*\*p<0.0001 versus TDP-43<sup>A315T</sup> at day 9. C, Null mutations in *unc-68* and *itr-1* reduce TDP-43<sup>A315T</sup>-mediated paralysis compared with control TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics. p<0.0001 for either for TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-68(e540)* or for TDP-43<sup>A315T</sup>; *itr-1(sa73)* versus TDP-43<sup>A315T</sup>. TDP-43<sup>A315T</sup>, n=90; TDP-43<sup>A315T</sup>; *itr-1(sa73)*, n=88; and TDP-43<sup>A315T</sup>; *unc-68(e540)*, n=84. D, Degeneration of motor neurons is reduced in adult day 9 TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics compared with controls. \*\*p<0.01 versus TDP-43<sup>A315T</sup> at day 9. E, Western blotting with a human anti-TDP-43 antibody revealed comparable levels of protein expression in all strains.

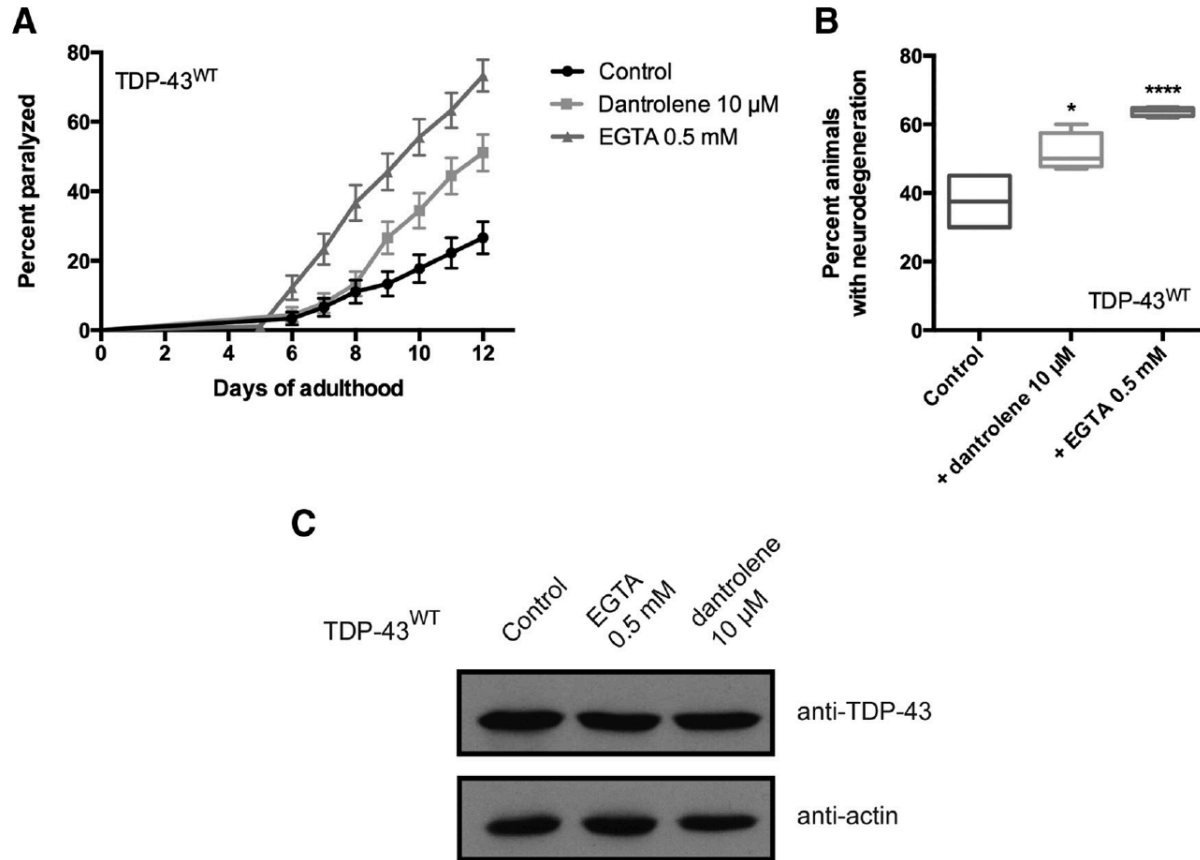




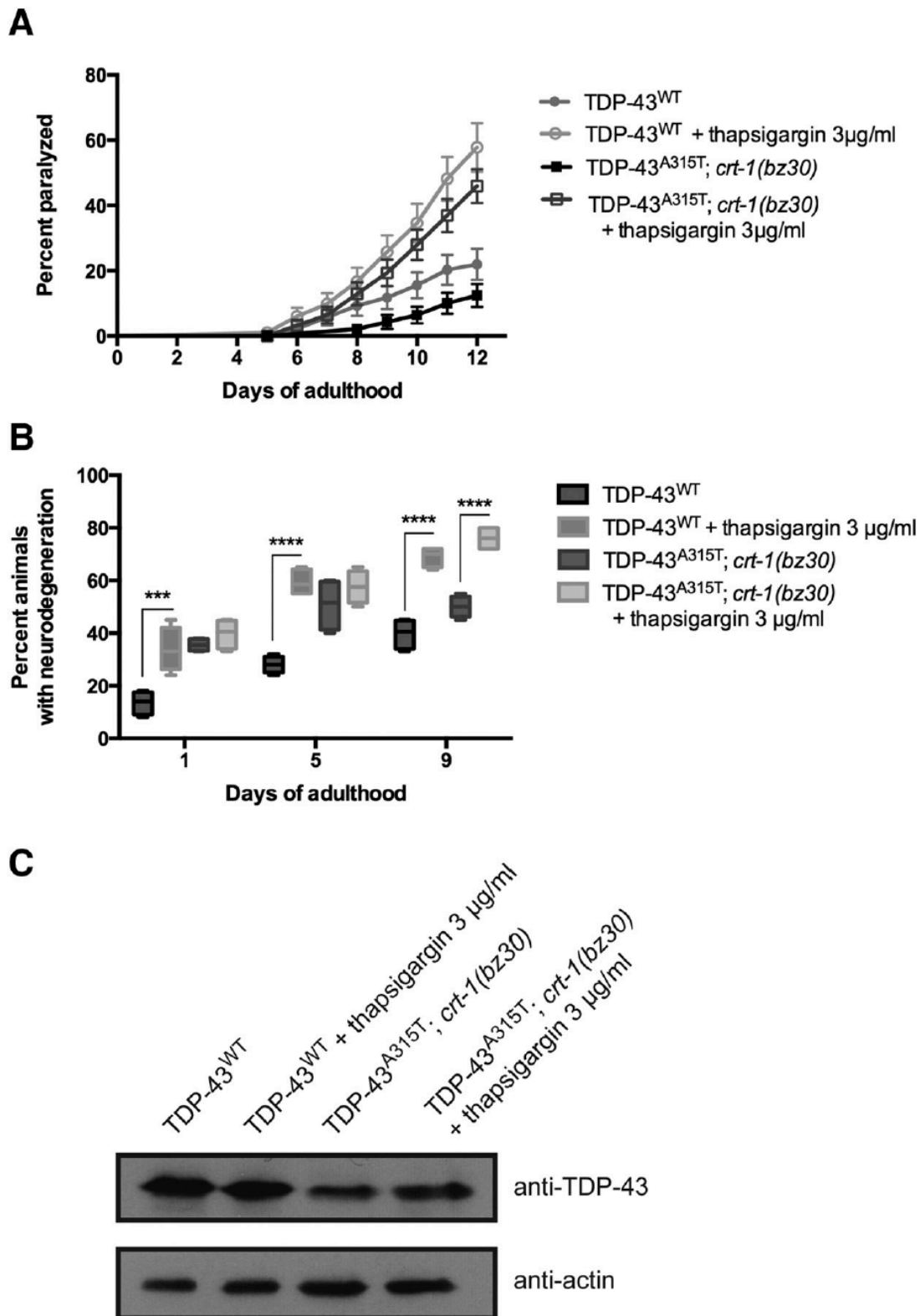
**Figure 2. Pharmacological manipulation of  $[Ca^{2+}]_i$  reduces TDP-43 neuronal toxicity.**

A, TDP-43 A315T transgenics treated with EGTA showed significantly less paralysis compared with untreated controls ( $p < 0.0001$  versus TDP-43<sup>A315T</sup>). The protective effect of EGTA was not additive to the suppression of TDP-43-mediated paralysis by mutation in either *crt-1* or *itr-1*.  $p = 0.8470$  versus TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)*; and  $p = 0.7817$  versus TDP-43<sup>A315T</sup>; *itr-1(sa73)*. TDP-43<sup>A315T</sup>,  $n = 90$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + EGTA,  $n = 181$ ; TDP-43<sup>A315T</sup>; *itr-1(sa73)*,  $n = 90$ ; TDP-43<sup>A315T</sup>; *itr-1(sa73)* EGTA,  $n = 90$ ; TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)*,  $n = 90$ ; TDP-

43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)* + EGTA, n=90. B, Degeneration of motor neurons in TDP-43<sup>A315T</sup> animals at day 9 of adulthood was reduced to comparable levels in TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics treated with EGTA alone or in combination with mutations in *crt-1* or *itr-1*. \*\*\*\*p<0.0001 versus TDP-43<sup>A315T</sup> at day 9. C, Treatment with dantrolene suppressed TDP-43<sup>A315T</sup>-mediated paralysis compared with untreated control animals (p=0.0031 versus TDP-43<sup>A315T</sup>). Suppression of TDP-43<sup>A315T</sup>-mediated paralysis by *crt-1* or *itr-1* was not significantly different from these same mutant strains treated with dantrolene. TDP-43<sup>A315T</sup>, n=114 ; TDP-43<sup>A315T</sup> + dantrolene, n=100; TDP-43<sup>A315T</sup>; *itr-1(sa73)*, n=88; TDP-43<sup>A315T</sup>; *itr-1(sa73)* + dantrolene, n=96; TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)*, n=90; TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)* + dantrolene, n=90. D, Degeneration of motor neurons, in TDP-43<sup>A315T</sup> animals at day 9 of adulthood was reduced to similar levels in TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics treated with dantrolene alone or in combination with mutations for *crt-1* or *itr-1*. \*\*p<0.01 versus TDP-43<sup>A315T</sup> at day 9; \*\*\*p<0.001 versus TDP-43<sup>A315T</sup> at day 9. E, TDP-43 protein expression was unchanged by culture conditions with EGTA or dantrolene.

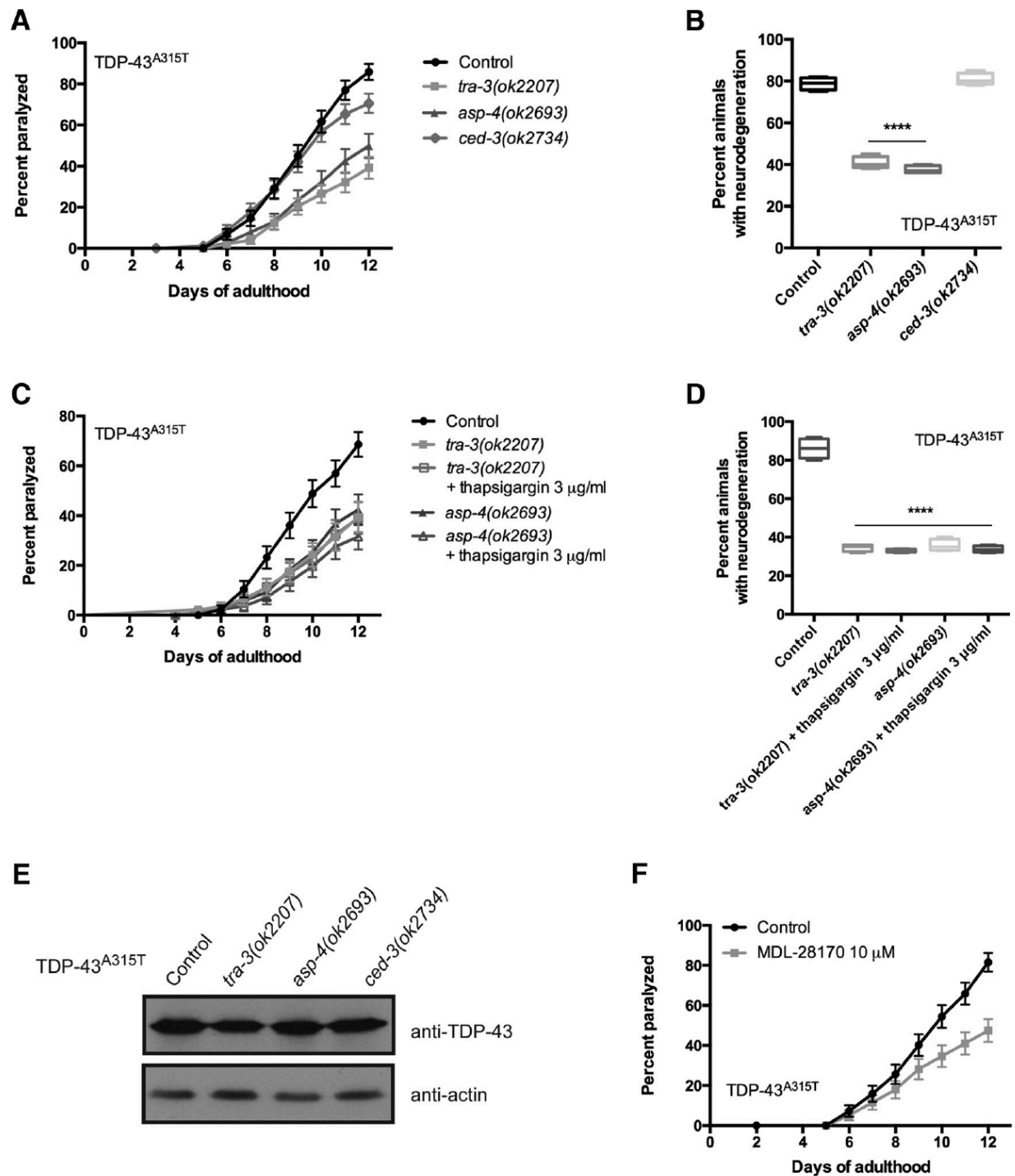


**Figure 3. Disrupted Ca<sup>2+</sup> homeostasis enhances wild-type TDP-43 toxicity.** A, Transgenic worms expressing TDP-43<sup>WT</sup> treated with either EGTA or dantrolene had increased rates of paralysis compared with untreated controls ( $p < 0.01$  for dantrolene-treated worms versus untreated TDP-43<sup>WT</sup> controls;  $p < 0.0001$  for EGTA-treated worms versus untreated TDP-43<sup>WT</sup> controls). TDP-43<sup>WT</sup>,  $n = 90$ ; TDP-43<sup>WT</sup> + dantrolene,  $n = 90$ ; TDP-43<sup>WT</sup> + EGTA,  $n = 90$ . B, Treatment with dantrolene or EGTA increased neurodegeneration in adults on day 9; TDP-43<sup>WT</sup> transgenics compared with untreated TDP-43<sup>WT</sup> transgenics. \* $p < 0.05$  versus TDP-43<sup>WT</sup> at day 9, \*\*\*\* $p < 0.0001$  versus TDP-43<sup>WT</sup> at day 9. C, Similar levels of TDP-43 proteins were detected by Western blotting in untreated TDP-43<sup>WT</sup> transgenics compared with animals treated with EGTA or dantrolene.



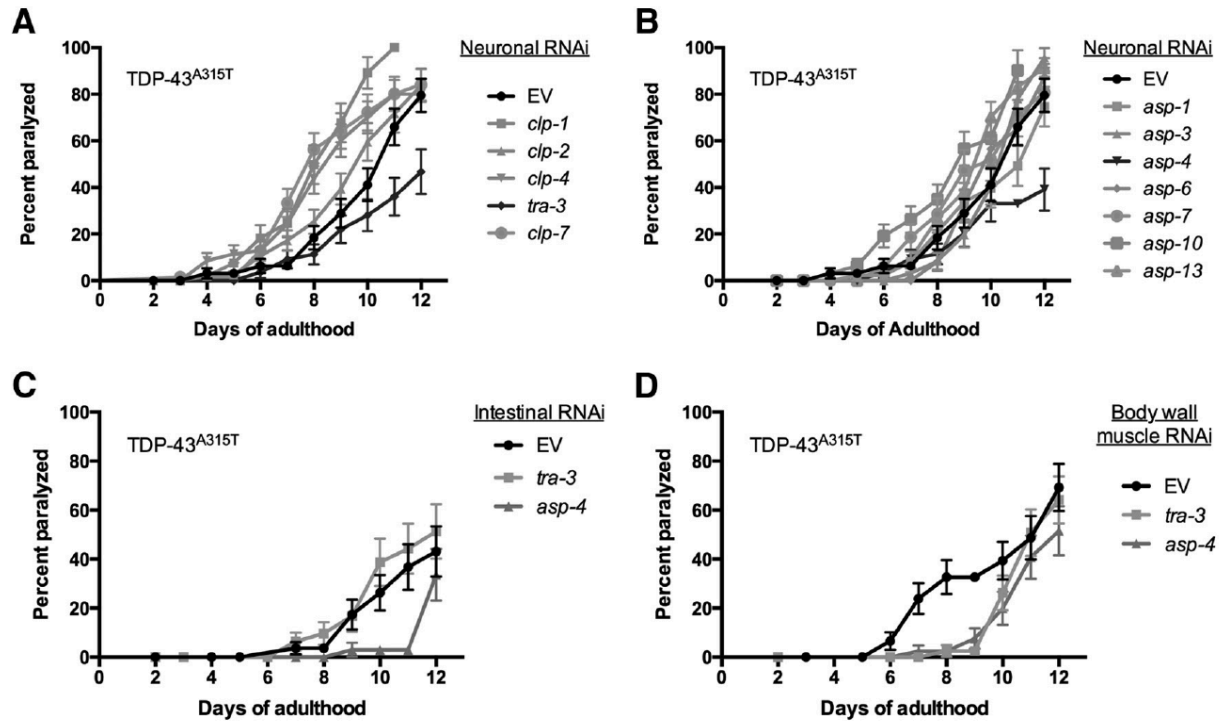
**Figure 4. Forced release of ER Ca<sup>2+</sup> stores enhances TDP-43 neuronal toxicity.** A, Paralysis was enhanced in TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)* and TDP-43<sup>WT</sup> transgenics treated with thapsigargin compared with untreated transgenic controls.  $p < 0.001$  for TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-*

*1(bz30)* animals versus those treated with thapsigargin;  $p < 0.001$  for TDP-43<sup>WT</sup> versus those treated with thapsigargin. TDP-43<sup>WT</sup>, n=98; TDP-43<sup>WT</sup> + thapsigargin, n=95; TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)*, n=96; TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)* + thapsigargin, n=100. B, Thapsigargin enhanced neurodegeneration transgenics expressing TDP-43<sup>WT</sup> at days 1, 5, and 9 of adulthood compared with untreated controls. The suppression of neurodegeneration in TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)* animals was lost by thapsigargin treatment in adult day 9 transgenics. \*\*\* $p < 0.001$  versus TDP-43<sup>WT</sup> at day 1; \*\*\*\* $p < 0.0001$  versus TDP-43<sup>WT</sup> or TDP-43<sup>A315T</sup>; *crt-1(bz30)*. C, Thapsigargin did not affect TDP-43 protein expression in TDP-43<sup>WT</sup> or TDP-43<sup>A315T</sup> worms.



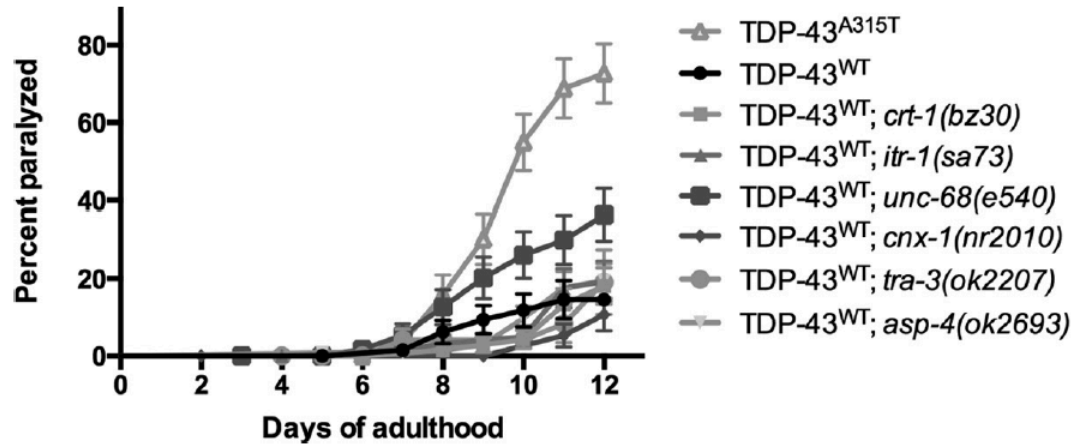
**Figure 5. Calpain and aspartyl proteases facilitate TDP-43 neuronal toxicity.** A, Null mutations in *tra-3* or *asp-4* suppress age-dependent paralysis in TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics compared with TDP-43<sup>A315T</sup> controls. Mutation in *ced-3* had no significant effect on

paralysis phenotypes compared with TDP-43<sup>A315T</sup>.  $p < 0.0001$  for TDP-43<sup>A315T</sup>; *tra-3(ok2207)* or TDP-43<sup>A315T</sup>; *asp-4(ok2693)* versus TDP-43<sup>A315T</sup> transgenic controls. TDP-43<sup>A315T</sup>, n=90; TDP-43<sup>A315T</sup>; *tra-3(ok2207)*, n=102; TDP-43<sup>A315T</sup>; *asp-4(ok2693)*, n=79; TDP-43<sup>A315T</sup>; *ced-3(ok2734)*, n=96. B, Neurodegeneration was significantly reduced in adult, day 9, TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics by *tra-3* or *asp-4* null mutations compared with TDP-43<sup>A315T</sup> alone. A null mutation of *ced-3* failed to suppress TDP-43<sup>A315T</sup> neurodegeneration. \*\*\*\* $p < 0.0001$  versus TDP-43<sup>A315T</sup> at day 9. C, The suppression of TDP-43<sup>A315T</sup> -mediated paralysis by *tra-3* or *asp-4* was unaffected by the addition of thapsigargin.  $p < 0.0001$  for TDP-43<sup>A315T</sup> versus TDP-43<sup>A315T</sup>; *tra-3(ok2207)* or TDP-43<sup>A315T</sup>; *asp-4(ok2693)* with or without thapsigargin treatment. TDP-43<sup>A315T</sup>, n=90; TDP-43<sup>A315T</sup>; *tra-3(ok2207)*, n=90; TDP-43<sup>A315T</sup>; *tra-3(ok2207)* + thapsigargin, n=90; TDP-43<sup>A315T</sup>; *asp-4(ok2693)*, n=90; TDP-43<sup>A315T</sup>; *asp-4(ok2693)* + thapsigargin, n=90. D, Suppression of age-dependent neurodegeneration in TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics by *tra-3* or *asp-4* mutations was unchanged by thapsigargin treatment. \*\*\*\* $p < 0.0001$  versus TDP-43<sup>A315T</sup> at day 9. E, Null mutations of *tra-3*, *asp-4*, or *ced-3* did not affect TDP-43 protein expression. F, The calpain inhibitor MDL-28170 reduced paralysis in TDP-43<sup>A315T</sup> transgenics.  $p < 0.001$  for treated versus untreated TDP-43<sup>A315T</sup> animals. TDP-43<sup>A315T</sup>, n=92; TDP-43<sup>A315T</sup> + MDL-28170, n=82.

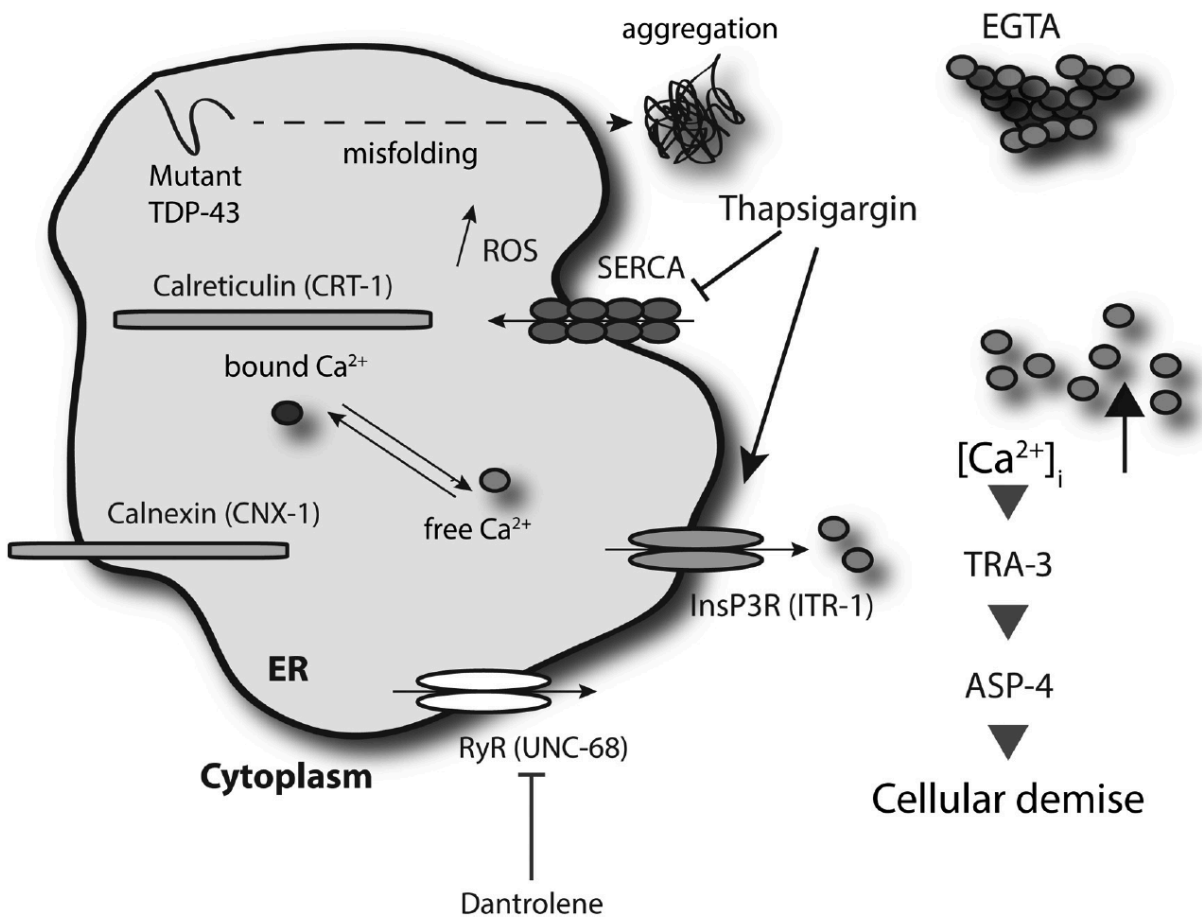


**Figure 6. TDP-43-mediated motility defects require *tra-3* and *asp-4* in the nervous system.** A, RNAi against *tra-3* suppressed TDP-43<sup>A315T</sup>-mediated paralysis.  $p < 0.05$  for TDP-43<sup>A315T</sup> treated with *tra-3*(RNAi) versus TDP-43<sup>A315T</sup> treated with EV control RNAi. TDP-43<sup>A315T</sup> + EV,  $n=71$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *clp-1*(RNAi),  $n=71$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *clp-2*(RNAi),  $n=84$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *clp-4*(RNAi),  $n=79$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *tra-3*(RNAi),  $n=68$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *clp-7*(RNAi),  $n=69$ . B, RNAi against *asp-4* suppressed TDP-43<sup>A315T</sup>-mediated paralysis.  $p < 0.05$  for TDP-43<sup>A315T</sup> treated with *asp-4*(RNAi) versus TDP-43<sup>A315T</sup> treated with EV control RNAi. TDP-43<sup>A315T</sup> + EV,  $n=71$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *asp-1*(RNAi),  $n=54$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *asp-3*(RNAi),  $n=66$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *asp-4*(RNAi),  $n=67$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *asp-6*(RNAi),  $n=59$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *asp-7*(RNAi),  $n=62$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *asp-10*(RNAi),  $n=68$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *asp-13*(RNAi),  $n=58$ . C, There were no significant differences in the rates of paralysis for TDP-43<sup>A315T</sup> sensitized for intestine-specific RNAi by treatment with EV(RNAi), *tra-3*(RNAi), or *asp-4*(RNAi). TDP-43<sup>A315T</sup> + EV,  $n=77$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *tra-3*(RNAi),  $n=54$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *asp-4*(RNAi),  $n=59$ . D, There were no significant differences in the rates of paralysis for TDP-43<sup>A315T</sup> sensitized for body wall muscle-specific RNAi by treatment with EV(RNAi), *tra-3*(RNAi), or *asp-4*(RNAi). TDP-43<sup>A315T</sup> + EV,  $n=64$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *tra-3*(RNAi),  $n=51$ ; TDP-43<sup>A315T</sup> + *asp-4*(RNAi),  $n=60$ .





**Figure 7. Calcium homeostasis and protease genes do not suppress motility defects in TDP-43 WT animals.** There was no significant suppression of TDP-43<sup>WT</sup> motility defects by Ca<sup>2+</sup> or protease gene mutations.  $p < 0.001$  for TDP-43<sup>A315T</sup> versus TDP-43<sup>WT</sup>. TDP-43<sup>A315T</sup>, n=81; TDP-43<sup>WT</sup>, n=65; TDP-43<sup>WT</sup>; *crt-1(bz30)*, n=71; TDP-43<sup>WT</sup>; *itr-1(sa73)*, n=71; TDP-43<sup>WT</sup>; *unc-68(e540)*, n=60; TDP-43<sup>WT</sup>; *cnx-1(nr2010)*, n=61; TDP-43<sup>WT</sup>; *tra-3(ok2207)*, n=71; TDP-43<sup>WT</sup>; *asp-4(ok2693)*, n=115.



**Figure 8. Working model for TDP-43 and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent necrosis-like neuronal toxicity.** The chronic stress induced by protein misfolding and aggregation of mutant TDP-43 proteins may lead to inappropriate release of  $\text{Ca}^{2+}$  from ER stores into the cytoplasm. The resultant  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase is essential for downstream events, including activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated TRA-3 calpain protease, which in turn mediates leakage of killer aspartyl proteases (ASP-4), leading to neuronal dysfunction and cell death. Mutations affecting ER  $\text{Ca}^{2+}$  storage (calreticulin and calnexin) or ER calcium release (InsP3R and RYR calcium release channels) disrupt release and are therefore neuroprotective. Pharmacological reduction of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by EGTA or dantrolene is also neuroprotective, while a forced increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by thapsigargin enhances neuronal toxicity. Disabling the activity of calpain or aspartyl proteases also protects against TDP-43-associated neuronal dysfunction and degeneration.

## ANNEXE 2

**Annexe 2 : miRNAs dérégulés dans la SLA décrits actuellement**

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>let-7a-5P</i>	Diminution ( $p<0,02$ ) d'après Mann-Whitney U test, dans le LCR de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-miR-39-3P</i>	Benigni <i>et al.</i> 2016
<i>let-7b</i>	Diminution dans le serum	liaison directe à TDP-43	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-miR-39-3P</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans des cellules dérivées de lymphoblastes de patients ayant une mutation C9ORF72 ou FUS	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U6	
	Diminution dans des lignées cellulaires déplétées en TDP-43	possiblement par liaison directe	Humain	Normalisé par rapport à la GAPDH	Buratti <i>et al.</i> 2010
	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>let-7b-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>let-7b-5P</i>	Diminution dans le LCR de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-miR-39-3P</i>	Benigni <i>et al.</i> 2016
<i>let-7c</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>let-7d</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>let-7d-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique et diminution en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>let-7e-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	via EIF2C4	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>let-7f-5P</i>	Diminution ( $p<0,02$ ) d'après Mann-Whitney U test, dans le LCR de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-miR-39-3P</i>	Benigni <i>et al.</i> 2016
<i>let-7g-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique et diminution en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>let-7i</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-1</i>	Diminution dans les muscles en phase terminale et dans le plasma de souris SOD1 vs souris saines	Inconnu	Souris	Normalisé par rapport à snoRNA202 dans les muscles et <i>Cel-miR-39</i> dans le plasma	Toivonen <i>et al.</i> 2014
	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray et confirmation par qPCR normalisé par rapport à U6	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-7a</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-7a-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-9</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1, validation par qPCR	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30 et normalisation de la qPCR par U6	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans hippocampe et zone sous-ventriculaire et augmentation dans le cortex moteur et le tronc cérébral dans les derniers stades de la maladie dans un modèle SOD1 murin	via PTEN & STAT3	Souris	Normalisé par rapport à 18S	Marcuzzo <i>et al.</i> 2015
	Diminution dans un modèle de cellules souches pluripotentes induites de neurones de patients, ayant une mutation A90V ou M337V dans <i>tardbp</i>	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U6	Zhang <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray et validation par qPCR normalisé par rapport à U6	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR9-5P</i>	Diminution dans des cellules dérivées de lymphoblastes de patients ayant une mutation FUS	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U6	Freischmidt <i>et al.</i> 2013
<i>miR-9a</i>	Diminution dans un modèle TDP-43 chez la drosophile	Interaction génétique indirecte avec TDP-43	Drosophila	Normalisé par rapport à RP-49 et analyse par méthode $\Delta Ct-\Delta Ct$ .	Li <i>et al.</i> 2013
<i>miR-10a</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-10a-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-10a-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique à jour 95 et 108 postnatal	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-10b</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-15a</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-15b</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-15b-5P</i>	Diminution dans le LCR de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-miR-39-3P</i>	Benigni <i>et al.</i> 2016
<i>mir16-2*</i>	Détection dans lysat de moelle-épinrière de patients ayant la SLA sporadique et non détecté chez les contrôles	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2013

Suite (2)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-17</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Réprimé par HIF1A par inhibition de l'expression de c-myc	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
	Augmentation dans des modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris, Rat	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR-18a-3P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-18b-3P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR19a</i>	Diminution dans l'hipocampe et le tronc cérébral et augmentation dans le cortex moteur dans les derniers stades de la maladie chez un modèle SOD1 murin	via CCND2, SOCS1 & SOX6	Souris	Normalisé par rapport à 18S	Marcuzzo <i>et al.</i> 2015
<i>miR19b</i>	Diminution dans le tronc cérébral et le cortex moteur et augmentation dans l'hipocampe dans les derniers stades de la maladie chez un modèle SOD1 murin	via PTEN, SOCS1 & SOX6	Souris	Normalisé par rapport à 18S	Marcuzzo <i>et al.</i> 2015
	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
	Augmentation dans des modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris, Rat	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR-20a</i>	Augmentation dans des modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris, Rat	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR-20b</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Régule HIF1A, VEGF et est régulé par HIF1A	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-20b-5P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-21</i>	Diminution dans le plasma de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Normalisé par rapport à <i>Cel-miR-39</i>	Toivonen <i>et al.</i> 2014
<i>miR-21-5P</i>	Diminution dans le LCR de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-miR-39-3P</i>	Benigni <i>et al.</i> 2016
<i>miR-21a-3P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-22</i>	Augmentation dans la microglie de souris SOD1 vs souris non-transgéniques	via P2X7 receptor	Souris	Normalisé par rapport à U6	Parisi <i>et al.</i> 2013
<i>miR-23a</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Cible l'ARNm NFL	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2013
	Augmentation chez les patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RPLPO	Russell <i>et al.</i> 2013
	Augmentation dans lignées cellulaires déplétées en TDP-43	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à la GAPDH	Buratti <i>et al.</i> 2010
	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-23a-3P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR23b</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Cible l'ARNm NFL	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-24</i>	Diminution dans le plasma de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Normalisé par rapport à <i>Cel-miR-39</i>	Toivonen <i>et al.</i> 2014
<i>miR-24-3P</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-24-2</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de patients ayant la SLA familiale et sporadique ou dans des modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris, Rat et Humain	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR-26b</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-26b-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-27a</i>	Diminution de ce miRNA spécifique des muscles dans le sérum de patients SLA	Inconnu	Humain		Tasca <i>et al.</i> 2016

Suite (3)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-27a-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-27b</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-27b-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-28a-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-29a</i>	Augmentation dans la moelle-épineière lombaire de souris SOD1	Inconnu	Souris	Normalisé par rapport à RNU19	Nolan <i>et al.</i> 2014
	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray et validation par qPCR normalisé par rapport à U6	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-29a-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-29b</i>	Augmentation chez les patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RPLPO	Russell <i>et al.</i> 2013
	Augmentation (faible) dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Augmentation dans le cortex de souris SOD1	Inconnu	Souris	Normalisé par rapport à U6	Yang <i>et al.</i> 2015
	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray et validation par qPCR normalisé par rapport à U6	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-29b-2-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-29b-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-29b-1-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et augmentation en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-29c</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray et validation par qPCR normalisé par rapport à U6	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-30a</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Cible l'ARNm NFL	Humain	Normalisé par rapport à let-7a	Campos-melo <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-30a-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique à jour 95, 108 et 125 postnatal	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-30b</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Cible l'ARNm NFL	Humain	Normalisé par rapport à let-7a	Campos-melo <i>et al.</i> 2013
	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-30d-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-30e</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-31</i>	Augmentation chez les patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RPLPO	Russell <i>et al.</i> 2013
<i>miR-31-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-34c</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique à jour 95 puis augmentation à jour 108 postnatal	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-34c-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-92a</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-93</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015

## Suite (4)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-96-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-99b</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-100</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray et validation par qPCR normalisée par rapport à U6	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-101a-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et diminution en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-101b-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-103-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-106a</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inconnu	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
	Augmentation dans des modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris et Rat	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR-106a-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-106b</i>	Augmentation dans le serum de patients ayant la SLA vs patients sains	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à Cel-miR-39	Toivonen <i>et al.</i> 2014
	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-107</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Cible HIF-1A et inhibe VEGF et HIF-1B	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
<i>miR-124a</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	via le transporteur au glutamate EAAT2/GLT1	Souris	Normalisé par rapport à snoRNA-202	Morel <i>et al.</i> 2013
	Augmentation dans l'hipocampe, la zone sous-ventriculaire, le cortex moteur et le tronc cérébral dans un modèle de souris âgées SOD1	via les protéines DLX2, SOX9 et STAT3	Souris	Normalisé par rapport à 18S	Marcuzzo <i>et al.</i> 2015
<i>miR-125a-3P</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inconnu	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
<i>miR-125b</i>	Diminution dans la zone sous-ventriculaire et l'hipocampe et augmentation dans le cortex moteur dans les derniers stades de la maladie chez un modèle SOD1 murin	via sox6	Souris	Normalisé par rapport à 18S	Marcuzzo <i>et al.</i> 2015
	Augmentation dans la moelle-épineière lombaire de souris SOD1	Modulation de NF-κB via A20	Souris	Normalisé par rapport à U6	Parisi <i>et al.</i> 2016
<i>miR125b-5P</i>	Augmentation dans la microglie de souris SOD1 vs souris non-transgéniques	via P2X7 receptor, STAT3, TNFα	Souris	Normalisé par rapport à U6	Parisi <i>et al.</i> 2013
<i>miR-126-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-127</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-128a</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-128-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Normalisé par rapport à U6	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-129-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-129-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-130a-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR132</i>	Diminution dans les cellules SHSY5Y et Hela déplétées en TDP-43 par siARN	Directe liaison à TDP-43 et recrute DICER & DROSHA	Humain	Normalisé par rapport à U6	Kawahara <i>et al.</i> 2014



Suite (5)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR132-3P</i>	Diminution dans le serum et le LCR de patients ayant la SLA sporadique	Liaison directe à TDP43	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans des cellules dérivées de lymphoblastes de patients ayant une mutation TDP-43, C9ORF72 ou FUS, ou avec un forme sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U6	
	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-132-5P</i>	Diminution dans le serum et le LCR de patients ayant la SLA sporadique	Liaison directe à TDP43	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans des cellules dérivées de lymphoblastes de patients ayant une mutation TDP-43, C9ORF72 ou FUS, ou avec un forme sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U6	
	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-133a</i>	Diminution dans les muscles et le plasma de souris SOD1 en phase symptomatique	Inconnu	Souris	Normalisé par rapport à snoRNA202 dans les muscles et <i>Cel-mir-39</i> dans le plasma	Toivonen <i>et al.</i> 2014
	Augmentation de ce miRNA spécifique des muscles dans le sérum de patients SLA	Inconnu	Humain		Tasca <i>et al.</i> 2016
	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-133b</i>	Diminution dans les muscles et le plasma de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Normalisé par rapport à snoRNA202 dans les muscles et <i>Cel-mir-39</i> dans le plasma	Toivonen <i>et al.</i> 2014
	Augmentation de ce miRNA spécifique des muscles dans le sérum de patients SLA	Inconnu	Humain		Tasca <i>et al.</i> 2016
	Diminution (3 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	via AQP1 et CD4	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-133b-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-136-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-136-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-137-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-138-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-138-1-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-138-2-3P</i>	Diminution (3 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-139-3P</i>	Prédit par un algorithme des sites cibles de miRNAs basés sur 35 gènes associés à la SLA	Inconnu	Humain	Prédiction par algorithme	Shinde <i>et al.</i> 2013
<i>miR-139-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique à jour 95 postnatal puis augmentation à jour 108 et à nouveau diminution à jour 122	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Diminution (3 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-140-3P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	via CD4	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-142-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de patients ayant la SLA familiale et sporadique ou dans des modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris, Rat et Humain	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR-142-5P</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inconnu	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
	Augmentation (2,2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
	Augmentation dans la moelle-épineière de patients ayant la SLA familiale et sporadique ou dans des modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris, Rat et Humain	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR143</i>	Diminution dans les cellules SHSY5Y et Hela déplétées en TDP-43 par siARN	Directe liaison à TDP-43 et recrute DICER & DROSHA	Humain	Normalisé par rapport à U6	Kawahara <i>et al.</i> 2014
<i>miR143-3P</i>	Diminution dans le sérum et le LCR de patients ayant la SLA sporadique	liaison directe à TDP43	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans des cellules dérivées de lymphoblastes de patients ayant une mutation SOD1, TDP-43, C9ORF72 ou FUS, ou avec un forme sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U6	



Suite (6)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR143-5P</i>	Diminution dans le serum et le LCR de patients ayant la SLA sporadique	bind TDP43	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans des cellules dérivées de lymphoblastes de patients ayant une mutation SOD1, TDP-43, C9ORF72 ou FUS, ou avec une forme sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U6	
<i>miR-145</i>	Diminution dans les muscles de souris SOD1 en phase dymptomatiques et dans le plasma en phase terminale	Inconnu	Souris	Normalisé par rapport à snoRNA202 dans les muscles et <i>Cel-miR-39</i> dans le plasma	Toivonen <i>et al.</i> 2014
<i>miR-146a</i>	Détection dans lysat de moelle-épinrière de patients ayant la SLA sporadique et non détecté chez les contrôles	Cible l'ARNm NFL	Humain	Normalisé par rapport à let-7a	Campos-melo <i>et al.</i> 2013
	Augmentation dans la moelle-épinrière de patients ayant la SLA familiale et sporadique ou dans des modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris, Rat et Humain	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR-146b</i>	Augmentation dans la microglie de souris SOD1 vs souris non-transgéniques	via P2X7 receptor	Souris	Normalisé par rapport à U6	Parisi <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Augmentation dans la moelle-épinrière de patients ayant la SLA familiale et sporadique ou dans des modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris, Rat et Humain	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR-146b-5P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-148a-3P</i>	Diminution dans le LCR de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-miR-39-3P</i>	Benigni <i>et al.</i> 2016
<i>miR-148b-3P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-148b-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	via FAS	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-149</i>	Diminution dans des leucocytes de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U49	De Felice <i>et al.</i> 2012
	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inconnu	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
	Prédit par un algorithme des sites cibles de miRNAs basés sur 35 gènes associés à la SLA	Inconnu	Humain	Prédiction par algorithme	Shinde <i>et al.</i> 2013
<i>miR-149-3P</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-149-5P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-151-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique et diminution en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-154-3P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique à jour 95 postnatal puis augmentation à jour 108	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-154-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-155</i>	Augmentation dans la microglie de souris SOD1 vs souris non-transgéniques	via P2X7 receptor	Souris	Normalisé par rapport à U6	Parisi <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inhibe l'expression de HIF-1A	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
	Augmentation (1,5 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
	Augmentation dans la moelle-épinrière de patients ayant la SLA familiale et sporadique ou dans des modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris, Rat et Humain	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR-181a</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-181a-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Augmentation dans le LCR de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-miR-39-3P</i>	Benigni <i>et al.</i> 2016
<i>miR-181c</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-182-5P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013

Suite (7)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-183-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-184</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-188-5P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-189-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-190a</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-190a-5P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-192</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Cible l'ARNm NFL	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR193a-5P</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Cible l'ARNm NFL	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2013
<i>miR-194</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-195-5P</i>	Diminution dans le LCR de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-miR-39-3P</i>	Benigni <i>et al.</i> 2016
<i>miR-196a-1-3P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-196b</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-199-3P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-204-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-206</i>	Augmentation dans muscle de patients et de souris SOD1	via histone deacetylase & voie de signalisation FGF	Souris et Humain	Normalisé par rapport à U6	Williams <i>et al.</i> 2009
	Augmentation dans le plasma et les muscles de souris SOD1 corrélé avec la progression de la maladie et augmentation dans le serum de patients SLA	Inconnu	Souris et Humain	Normalisé par rapport à snoRNA202 dans les muscles et <i>Cel-miR-39</i> dans le plasma	Toivonen <i>et al.</i> 2014
	Augmentation de ce miRNA spécifique des muscles dans le sérum de patients SLA	Inconnu	Humain		Tasca <i>et al.</i> 2016
<i>miR-210</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-210-3P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-210-5P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique et augmentation en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-212-3P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-212-5P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-214</i>	Augmentation dans la microglie de souris SOD1 vs souris non-transgéniques	Inconnu	Souris	Normalisé par rapport à U6	Parisi <i>et al.</i> 2013
<i>miR-215</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Cible l'ARNm NFL	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2013
<i>miR-216a-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-216b</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-218-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-219</i>	Diminution dans la zone sous-ventriculaire dans les derniers stades de la maladie chez un modèle SOD1 murin	via FOXJ3, MKNK2 et PTEN	Souris	Normalisé par rapport à 18S	Marcuzzo <i>et al.</i> 2015
	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-219-1-3P</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inconnu	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015

Suite (8)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-219-2-3P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-223</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris et Rat	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR-290-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-291a-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-291b-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-292-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-293-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-296-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-298-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-299a-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-301a</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-302a-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-323-5P</i>	Prédit par un algorithme des sites cibles de miRNAs basés sur 35 gènes associés à la SLA	Inconnu	Humain	Prédiction par algorithme	Shinde <i>et al.</i> 2013
<i>miR-324-3P</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inconnu	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
	Prédit par un algorithme des sites cibles de miRNAs basés sur 35 gènes associés à la SLA	Inconnu	Humain	Prédiction par algorithme	Shinde <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>mi-325-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-326-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et diminution en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-328</i>	Diminution dans des leucocytes de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U49	De Felice <i>et al.</i> 2012
	Diminution (faible) dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-329</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-330-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-337-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016

Suite (9)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-338-3p</i>	Augmentation dans le cortex frontal de patients ainsi que dans leurs leucocytes.	via BACE1 and Aβ	Humain	Normalisé par rapport à RNU6B ou U49 selon l'étude	Shioya <i>et al.</i> 2010; De Felice <i>et al.</i> 2012
	Augmentation dans le sang, le LCR, le sérum et la moelle-épineuse de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à Hsa-let-7a dans le sérum et <i>mir-24</i> dans le LCR	De Felice <i>et al.</i> 2014
	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-338-5P</i>	Augmentation (très faible) dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineuse de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
	Augmentation dans la moelle-épineuse de modèles SOD1 de rat et de souris	Inconnu	Souris et Rat	Normalisé par rapport à U6	Koval <i>et al.</i> 2013
<i>miR-339-3P</i>	Prédit par un algorithme des sites cibles de miRNAs basés sur 35 gènes associés à la SLA	Inconnu	Humain	Prédiction par algorithme	Shinde <i>et al.</i> 2013
<i>miR-340-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-341-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-342-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-342-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-344c-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-350-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-351-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-361-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-362-5P</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inconnu	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
<i>miR-365</i>	Augmentation dans la microglie de souris SOD1 vs souris non-transgéniques	via IL-6 and TNFα	Souris	Normalisé par rapport à U6	Parisi <i>et al.</i> 2013
<i>miR-366-3P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineuse de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-369-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-369-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-370</i>	Prédit par un algorithme des sites cibles de miRNAs basés sur 35 gènes associés à la SLA	Inconnu	Humain	Prédiction par algorithme	Shinde <i>et al.</i> 2013
<i>miR-371-b-5P</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir-39-3p	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-373</i>	Augmentation dans le lysat de moelle-épineuse de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à let-7a	Campos-melo <i>et al.</i> 2013
	Augmentation dans lignées cellulaires déplétées en TDP-43	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à la GAPDH	Buratti <i>et al.</i> 2010
<i>miR-376a-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-376c-3P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineuse de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-382-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineuse de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineuse de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016



Suite (10)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-409-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-410</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-411-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-423-3P</i>	Prédit par un algorithme des sites cibles de miRNAs basés sur 35 gènes associés à la SLA	Inconnu	Humain	Prédiction par algorithme	Shinde <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-431-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-432-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-433</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-451</i>	Diminution dans des leucocytes de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U49	De Felice <i>et al.</i> 2012
	Diminution (faible) dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-454</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inconnu	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
<i>miR-455-3P</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale vs contrôles	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGCG (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir-39-3p	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-465a-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-466b-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-466c-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et augmentation en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-466e-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-466m-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-467b-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-484</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	inhibe FIS1	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
<i>miR-485-3P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-486-3P</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-487b</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-487b-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-491</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-491-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-494</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-494-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-495-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013

Suite (11)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-496a-5P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-497</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-501-3P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-506</i>	Augmentation dans le lysat de moelle-épinrière de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2014
<i>miR-508-5P</i>	Détection dans lysat de moelle-épinrière de patients ayant la SLA sporadique et non détecté chez les contrôles	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2015
<i>miR-518a-5P</i>	Augmentation dans le lysat de moelle-épinrière de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-518e*</i>	Augmentation dans le lysat de moelle-épinrière de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2017
<i>miR-520e</i>	Détection dans lysat de moelle-épinrière de patients contrôles et non détecté chez les patients SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2018
<i>miR-524-5P</i>	Détection dans lysat de moelle-épinrière de patients contrôles et non détecté chez les patients SLA	Cible l'ARNm NFL	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-532-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-532-5P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-539-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-541-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-542-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-543</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-544</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Campos-melo <i>et al.</i> 2019
<i>miR-544-5P</i>	Diminution dans la moelle-épinrière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-548a-5P</i>	Détection dans lysat de moelle-épinrière de patients contrôles et non détecté chez les patients SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2020
<i>miR-551a</i>	Augmentation dans le lysat de moelle-épinrière de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2021
<i>miR-556-5P</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Cible l'ARNm NFL	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2022
<i>miR-558</i>	Détection dans lysat de moelle-épinrière de patients ayant la SLA sporadique et non détecté chez les contrôles	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Kawahara <i>et al.</i> 2014
	Diminution dans les cellules SHSY5Y et Hela déplétées en TDP-43 par siARN	Directe liaison à TDP-43 et recrute DICER & DROSHA	Humain	Normalisé par rapport à U6	Kawahara <i>et al.</i> 2014
<i>miR-558-3P</i>	Diminution dans les cellules SHSY5Y et Hela déplétées en TDP-43 par siARN	Directe liaison à TDP-43 et recrute DICER & DROSHA	Humain	Normalisé par rapport à U6	Buratti <i>et al.</i> 2010
<i>mir-572</i>	Augmentation dans lignées cellulaires déplétées en TDP-43	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à la GAPDH	Kawahara <i>et al.</i> 2014
<i>miR-574-3P</i>	Diminution dans les cellules SHSY5Y et Hela déplétées en TDP-43 par siARN	directe liaison à TDP-43 et recrute DICER & DROSHA	Humain	Normalisé par rapport à U6	Freischmidt <i>et al.</i> 2013
	Diminution dans des cellules dérivées de lymphoblastes de patients ayant une mutation C9ORF72 ou FUS, ou avec un forme sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U6	Freischmidt <i>et al.</i> 2013
<i>miR-574-5P</i>	Augmentation dans le LCR de patients ayant la SLA sporadique	Liaison directe à TDP-43	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	
	Diminution dans des cellules dérivées de lymphoblastes de patients ayant une mutation C9ORF72 ou FUS, ou avec un forme sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U6	Zhou <i>et al.</i> 2013
	Augmentation dans la moelle-épinrière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Campos-melo <i>et al.</i> 2015
<i>miR-577</i>	Diminution (3 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	via CCL2, EIF2C4 et FAS	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-582-3P</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Cible l'ARNm NFL	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	De Felice <i>et al.</i> 2012
<i>miR-583</i>	Diminution dans des leucocytes de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U49	Raman <i>et al.</i> 2015
<i>miR-584-5P</i>	Diminution (3 fois) dans la moelle-épinrière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016

Suite (12)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-589</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inconnu	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
<i>miR-592</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-598</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Induit une sénescence <i>via</i> silent information regulator 1	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Campos-melo <i>et al.</i> 2015
	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-606</i>	Détection dans lysat de moelle-épineière de patients contrôles et non détecté chez les patients SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Campos-melo <i>et al.</i> 2015
<i>miR-612</i>	Détection dans lysat de moelle-épineière de patients contrôles et non détecté chez les patients SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-615-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Raman <i>et al.</i> 2015
<i>miR-616</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Supprime l'expression de TFPI2	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Raman <i>et al.</i> 2015
<i>miR-618</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inconnu	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Campos-melo <i>et al.</i> 2015
<i>miR-624</i>	Détection dans lysat de moelle-épineière de patients contrôles et non détecté chez les patients SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Raman <i>et al.</i> 2015
<i>miR-625-3P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-625-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-628-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-629</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Module l'expression du gène <i>NBS1</i>	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Buratti <i>et al.</i> 2010
	Diminution dans des lignées cellulaires déplétées en TDP-43	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à la GAPDH	Raman <i>et al.</i> 2015
<i>miR-636</i>	Diminution dans les fibroblastes de patients ayant la SLA sporadique vs fibroblastes contrôles	Inconnu	Humain	Normalisation par rapport à des miRNAs stables à travers les échantillons (déterminé par un algorithme NormFinder)	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-638</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	De Felice <i>et al.</i> 2012
	Diminution dans des leucocytes de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U49	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
	Diminution (faible) dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Campos-melo <i>et al.</i> 2015
<i>miR-642</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-645</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-647</i>	Détection dans lysat de moelle-épineière de patients contrôles et non détecté chez les patients SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Shinde <i>et al.</i> 2013
<i>miR-652</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1	Liaison à des ARNm spécifiques	Souris	Microarray	Dobrowolny <i>et al.</i> 2015
<i>miR-654-3P</i>	Diminution (3 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-654-5P</i>	Prédit par un algorithme des sites cibles de miRNAs basés sur 35 gènes associés à la SLA	Inconnu	Humain	Prédiction par algorithme	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-662</i>	Diminution (3 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-663</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Buratti <i>et al.</i> 2010
	Augmentation dans lignées cellulaires déplétées en TDP-43	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à la GAPDH	Freischmidt <i>et al.</i> 2013
<i>miR-663a</i>	Diminution dans des cellules dérivées de lymphoblastes de patients ayant une mutation FUS	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U6	De Felice <i>et al.</i> 2012
<i>miR-665</i>	Diminution dans des leucocytes de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U49	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
	Diminution (faible) dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-665-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-674-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-679-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-688</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-695</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-711</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et augmentation en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-714</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-743b-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Shinde <i>et al.</i> 2013
<i>miR-744</i>	Prédit par un algorithme des sites cibles de miRNAs basés sur 35 gènes associés à la SLA	Inconnu	Humain	Prédiction par algorithme	Buratti <i>et al.</i> 2010
	Augmentation dans lignées cellulaires déplétées en TDP-43	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à la GAPDH	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-744-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et diminution en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-760</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Shinde <i>et al.</i> 2013
	Prédit par un algorithme des sites cibles de miRNAs basés sur 35 gènes associés à la SLA	Inconnu	Humain	Prédiction par algorithme	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-761</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-804</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et augmentation en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-872-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Shinde <i>et al.</i> 2013
<i>miR-874</i>	Prédit par un algorithme des sites cibles de miRNAs basés sur 35 gènes associés à la SLA	Inconnu	Humain	Prédiction par algorithme	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-883b-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Campos-melo <i>et al.</i> 2015
<i>miR-885-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-890</i>	Augmentation dans le lysat de moelle-épineière de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à <i>let-7a</i>	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-935</i>	Diminution (3 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-939-5P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figuerola-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-940</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-1188-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-1193-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013



Suite (14)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-1198-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-1203</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-1224-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et diminution en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-1231</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-1233-3P</i>	Diminution (2 fois) dans la moelle-épineière de patients ( <i>post-mortem</i> ) ayant la SLA	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU44, RNU48 et U6	Figueroa-Romeo <i>et al.</i> 2016
<i>miR-1246</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-1247-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	De Felice <i>et al.</i> 2012
<i>miR-1275</i>	Diminution dans des leucocytes de patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à U49	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-1281</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale vs contrôles	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-1290</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR1306-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-1469</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-1825</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale vs contrôles	motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-1843a-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-1843b-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-1893</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-1915</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-1915-3P</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-1953</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-1958</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-1961</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-1973</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-2136</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014

Suite (15)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-2392</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-2861</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir-39-3p	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3065-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3066-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3066-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3067-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3068</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3068-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3082-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3084-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3094-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3105-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3107-5P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-3180-3P</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-3185</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir-39-3p	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-3196</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir-39-3p	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-3474</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-3613-5P</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale vs contrôles	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir-39-3p	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-3616-3P</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-3619-3P</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-3665</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir-39-3p	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-3911</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-3918</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014

Suite (16)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-3928</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-3940-5P</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-3960</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4257</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4270</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale vs contrôles	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4281</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4299</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Takahashi <i>et al.</i> 2016
<i>miR-4299</i>	Diminution dans le plasma de patients ayant une SLA sporadique. Analyse par microarray validée par qPCR	Inconnu	Humain	Contrôle endogène stable pour le microarray et normalisation de la qPCR par Cel-miR-39-3P	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4428</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4462</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4466</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4484</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4485</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4488</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4497</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4505</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNCGG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Freischmidt <i>et al.</i> 2014

Suite (17)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-4507</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale vs contrôles	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4508</i>	Diminution dans le sérum de patients possédant une mutation SLA en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4516</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4530</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4532</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale vs contrôles	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4648</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Takahashi <i>et al.</i> 2016
<i>miR-4649-5p</i>	Augmentation dans le plasma de patients ayant une SLA sporadique. Analyse par microarray validée par qPCR	Inconnu	Humain	Contrôle endogène stable pour le microarray et normalisation de la qPCR par <i>Cel-miR-39-3P</i>	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4667-5P</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4688</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4697</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4707-5P</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4716-3P</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4725-3P</i>	Diminution dans le sérum de patients possédant une mutation SLA en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4734</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale vs contrôles	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4740-5P</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4741</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4745-5P</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à <i>Cel-mir-39-3p</i>	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014

Suite (18)

miARN	Découverte	Effets biologiques proposés	Espèce	Méthode de quantification	Références
<i>miR-4749-5P</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4763-3P</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4787-3P</i>	Diminution dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Freischmidt <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4787-5P</i>	Diminution dans le sérum de patients ayant une SLA familiale ainsi qu'en pré-symptomatique	Motifs GNC GG (N étant G, A or U) ou NGGC (N étant G or C)	Humain	Normalisé par rapport à Cel-mir 39-3p	Wakabayashi <i>et al.</i> 2014
<i>miR-4792</i>	Augmentation dans le cortex moteur de patients ayant la SLA	Inconnu	Humain	Comparaison des intensités de signal entre les expériences + moyenne ajustée à 25. Les signaux > à 50 sont considérés significatifs	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-5105</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-5109</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et augmentation en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-5112</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-5115</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique et en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-5117-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-5120</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-5131</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-5616-5P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-5620-3P</i>	Diminution dans la moelle-épineière de souris SOD1 en symptomatique	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Zhou <i>et al.</i> 2013
<i>miR-5625-3P</i>	Augmentation dans la moelle-épineière de souris SOD1 en phase terminale	Inconnu	Souris	Microarray - moyenne sur les expériences avec intensité >30	Ishtiaq <i>et al.</i> 2014
<i>miR-b1123</i>	Augmentation chez les patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU6	Ishtiaq <i>et al.</i> 2014
<i>miR-b1336</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU6	Ishtiaq <i>et al.</i> 2014
<i>miR-b2403</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU6	Ishtiaq <i>et al.</i> 2014
<i>miR-b2948</i>	Augmentation chez les patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU6	Ishtiaq <i>et al.</i> 2014
<i>miR-b3265</i>	Augmentation chez les patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU6	Ishtiaq <i>et al.</i> 2014
<i>miR-b4652</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU6	Ishtiaq <i>et al.</i> 2014
<i>miR-b5539</i>	Augmentation chez les patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU6	Ishtiaq <i>et al.</i> 2014
<i>miR-sb659*</i>	Diminution chez les patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU6	Ishtiaq <i>et al.</i> 2014
<i>miR-sb1217</i>	Augmentation chez les patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU6	Ishtiaq <i>et al.</i> 2014
<i>miR-sb3998</i>	Augmentation chez les patients ayant la SLA sporadique	Inconnu	Humain	Normalisé par rapport à RNU6	Ishtiaq <i>et al.</i> 2015

## ANNEXE 3



### **ANNEXE 3 : PROTOCOLE D'IMMUNOMARQUAGE DE TDP-43 SUR *C. elegans***

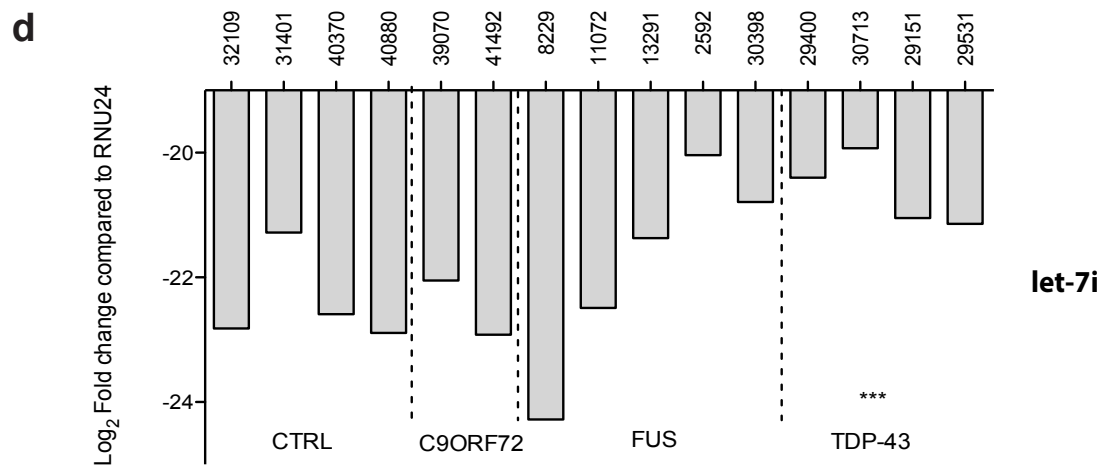
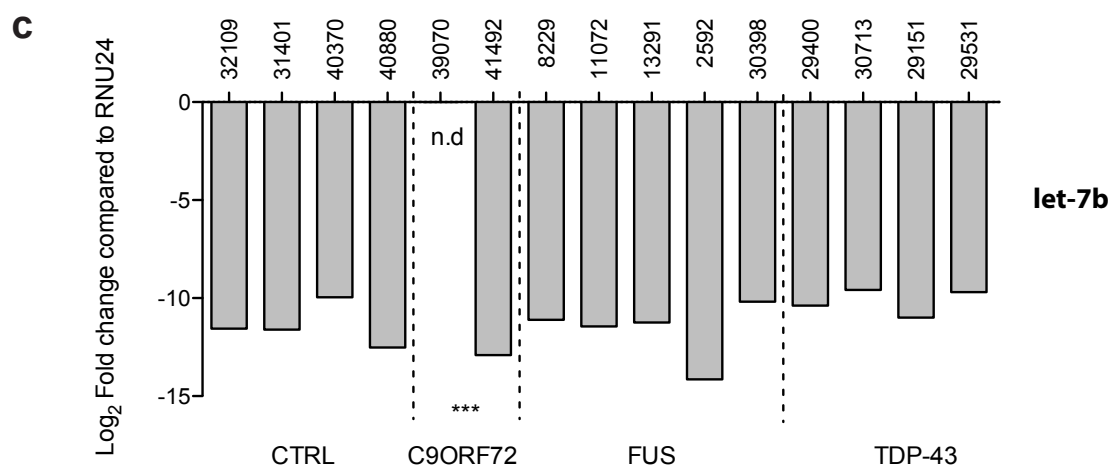
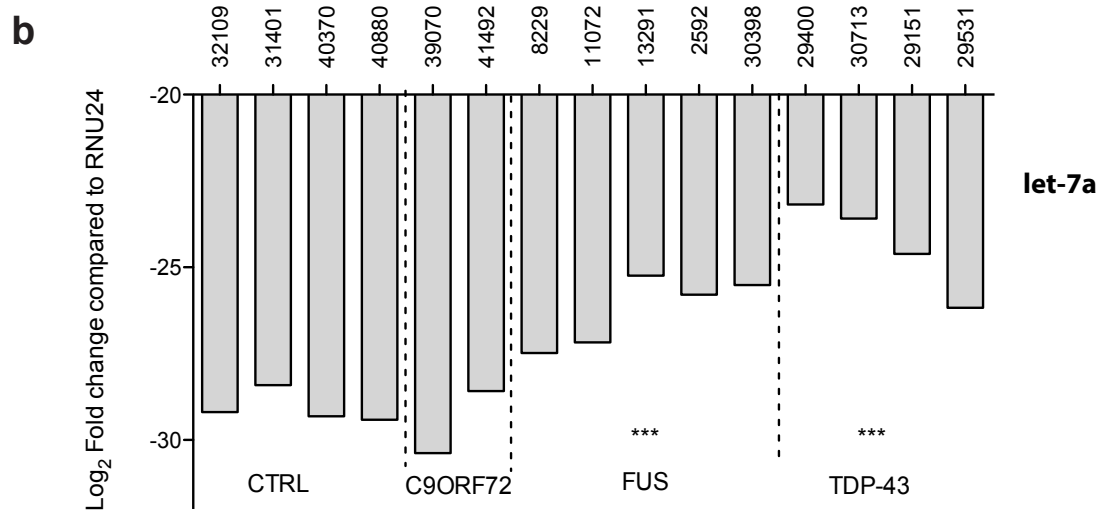
1. Récolter les vers à confluence de 3 à 5 boîtes de avec du tampon M9 dans des tubes Eppendorf 1.5mL.
2. Perméabilisation des cuticules : Placer l'Eppendorf à -80°C pour au moins 10 minutes
3. Décongeler sur glace
4. Processus de Fixation : Le surnageant est ôté et les animaux sont re-suspendus dans 1mL de méthanol froid pendant 5 minutes (Processus de fixation)
5. Laver 2 fois au PBS. Une centrifugation de 5 minutes à 4°C à 4000 rpm permettra d'ôter le PBS.
6. Blocage : Utiliser 1mL d'une solution de sérum de Singe (0,05mg/L BSA + 5% Donkey sérum de Singe + 0,2% Triton). Laisser 30 minutes à température ambiante.
7. Anticorps Primaire : Ajouter 500µL d'anticorps de lapin @-TDP-43 (1:200, Proteintech)
8. Laver 2 fois au PBS. Une centrifugation de 5 minutes à 4°C à 4000 rpm permettra d'ôter le PBS.
9. Anticorps Secondaire : Ajouter 500µL d'anticorps @-lapin-AlexaFluor 514 (1:200, ThermoFisher) pendant 45 minutes à température ambiante.
10. Laver une fois au PBS puis centrifuger à 4000 rpm à 4°C pendant 5 minutes.
11. Marquage des noyaux : Ajouter du Topro (1:300, Life Technologies, T3605) pendant 5 minutes à température ambiante.
12. Laver 2 fois au PBS
13. Monter sur lame pour la microscopie confocale grâce à une solution de montage (ProLong Live Antifade, ThermoFisher). Laisser sécher toute la nuit à 4°C.

## ANNEXE 4



**a**

let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGU <b>AUAGUU</b>
let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGU <b>GUGGUU</b>
let-7i	UGAGGUAGUAG <b>UUUGUGCU</b> GUU



**Annexe 4 : Quantification de sous-types de let-7 dans des cellules lymphoblastoïdes de patients ayant la SLA.** a. Séquences de let-7a, let-7b et let-7i. En rouge sont indiqués les nucléotides sources de changement. (b-d). Quantification de let-7a (b), let-7b (c) et let-7i (d) dans les échantillons de patients (TaqMan® MicroRNA Assays, ThermoFisher Scientific, 000377, 000378, 002221 respectivement). La quantification a été faite par une qPCR LightCycler 480 Instrument II (Roche). La normalisation a été réalisée grâce à l'ARN contrôle *sn2343* (small nucleolar RNA), vérifié stable entre les échantillons. Les résultats ont été fait en duplicats, utilisant la méthode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Les statistiques ont suivi la loi de Mann-Whitney. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

## ANNEXE 5

Etudes Cliniques	Statut	Pays	Effets	Résultats
Arimoclomol dans famille SOD1	En cours	E.U.	Agit sur la voie de réparation des protéines endommagées et sur HSP-70	-
Masitinib	En cours	Espagne	Inhibiteur de tyrosine-kinase	-
Ibudilast	En cours	E.U.	Anti-inflammatoire	-
VM202 en intramusculaire	En cours	E.U.	N.I.	-
GDC-0134	En cours	E.U.	Neuromodulateur	-
Toxine A Incobotulinum	En cours	Israël	Réduit les contractions musculaires excessives	-
CD163 soluble	En cours	Danemark	Marqueur inflammatoire	-
Nuedexta	En cours	E.U.	Contient dextrometorphane et quinine. Inhibe émotions involontaires	-
Exogabine	En cours	E.U.	Anticonvulsivant	-
Epi-589	En cours	E.U.	Antioxydant et modulateur de la NADPH dehydrogénase	-
RNS60	En cours	E.U.	Module la neuroinflammation	-
Rasagiline	En cours	E.U.	Inhibiteur de la MAO	-
Pimozide	En cours	Canada	Augmentation de la communication aux jonctions neuromusculaires du poisson et de la souris	-
Tocilizumab	En cours	E.U.	Bloque le système immunitaire et la relâche de IL-6	-
Interleukine -2	En cours	France	Inhibiteur immunitaire	-
L-Serine	En cours	E.U.	Active le récepteur NMDA	-
MicroARNs comme biomarqueurs	En cours	France	Récolte dans le sang, le LCR et biopsie de muscle	-
Transplantation de cellules mononucléaires de moelle-osseuse	En cours/complété	Monde	-	-
Transplantation de cellules souches	En cours/complété	Monde	-	-
Ozanezumab	Complété	Monde	Anticorps monoclonal ciblant la protéine NOGO-A	-
Diète riche en calorie/gras	Complété	E.U.	-	Négatifs
Tamoxifen & Créatine	Complété	E.U.	Le tamoxifen module les récepteurs aux oestrogènes et la créatine aide à l'apport d'énergie aux muscles	Négatifs
Mécobalamine	Complété	Japon	Favorise la synthèse de méthionine	Négatifs
Mémantine	Complété	Portugal	Antagoniste des récepteurs NMDA	-
Immunosuppression	Complété	E.U.	Immunosuppression	-
IGF-1	Complété	E.U.	Facteur de croissance	Négatifs
Vitamine D	Complété	France	Antioxydant	-
MCI-186	Complété	Japon	Neuroprotecteur	-
Tauroursodeoxycholic	Complété	Italie	Propriétés neuroprotectives, antiapoptotiques et antioxydantes	Bons résultats
SNN0029 avec facteur de croissance VEGF165	Complété	Belgique	Neuroprotecteur	-
SB-509	Complété	E.U.	N.I.	-
Dexpramipexole	Complété	Monde	Neuroprotecteur et améliore les fonctions mitochondriales	-
R(+)-Pramipexole	Complété	E.U.	Agoniste dopaminergique	-
Hormone de croissance	Complété	Italie	Hormone de croissance	-
Fingolimod	Complété	E.U.	Inhibe le système immunitaire	Négatifs
Mexiletine	Complété	E.U.	Diminue les symptômes myotoniques	Négatifs
Tirasemtiv	Complété	E.U.	Action musculaire	-
Sodium Valproate	Complété	Pays-Bas	Actions sur le système nerveux	-
Ceftriaxone	Complété	E.U.	Antibiotique qui protège de l'excitotoxicité au glutamate	Négatifs
Vitamine E	Complété	Canada	Antioxydant	-
NP001	Complété	E.U.	Module le système immunitaire	-
GSK1223249	Complété	UK, Italie, France, E.U.	Inhibe les protéines qui empêchent la croissance nerveuse	-

Etudes Cliniques	Statut	Pays	Effets	Résultats
Dextromethorphan hydrobromide	Complété	Argentine, Brésil, E.U.	Antagoniste des récepteurs NMDA	Négatifs
Endocanabinoïdes Palmitoylethanolamide	Complété	Italie	Agit sur les récepteurs à l'Ach	-
G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor) et erythropoetine (EPO)	Complété	Iran, Allemagne	Influence les capacités motrices	-
GM604	Complété	E.U.	Peptide signal et régulateur du système nerveux	-
Zinc et Cuivre à haute dose	Complété	E.U.	N.I.	-
Lithium en complément du riluzole	Terminé	Canada, E.U.	Neuroprotecteur	Effets mitigés
Talampanel	Terminé	Monde	Agoniste des récepteurs AMPA	-
Ploglitazone	Terminé	Allemagne	Agit sur les cellules musculaires	-
Stimulation du nerf phrénique	Terminé	France	Améliorations motrices	-

**Annexe 5 : Etudes cliniques portant sur la sclérose latérale amyotrophique des 10 dernières années au début 2016.** Les résultats négatifs indiquent que les essais cliniques ne se sont pas poursuivis pour cause d'effets délétères. N.I., Non indiqué ; IGF-1, Insulin-growth factor -1 ; E.U., Etats-Unis ; UK, United-Kingdom ; HSP-70, Heat-shock protein -70 ; NADPH, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ; MAO, Monoamine oxydase ; IL-6, Interleukine -6 ; NMDA, N-Methyl-D-aspartic acid; LCR, Liquide céphalo-rachidien ; Ach, Acétylcholine ; AMPA,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid.

## ANNEXE 6

Maladies / Désordres	Statut (Date de début)	Pays	microARNs
Cancer du sein	En cours (2016)	Chine	Biomarqueurs
	En cours (2015)	Israël	Biomarqueurs
	En cours (2014)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2014)	Pologne	Biomarqueurs
	En cours (2014)	France	Biomarqueurs
	En cours (2014)	Canada	Biomarqueurs
	En cours (2013)	Canada	Biomarqueurs
	En cours (2012)	Irlande	Biomarqueurs
	En cours (2012)	France	Biomarqueurs
	En cours (2010)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2010)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2008)	Norvège	Biomarqueurs
	En cours (2007)	E.U.	Biomarqueurs
Cancer colorectal	En cours (2016)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2015)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2015)	Chine	Biomarqueurs
	En cours (2015)	Chine	Injection de 6 miRNAs (miR-21, miR-29a-5P, miR-103a-3P, miR-106b-5P, miR-143-5P et miR-215) en adjuvant
	En cours (2014)	Allemagne	Biomarqueurs
	En cours (2014)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2013)	Taiwan	Biomarqueurs
	En cours (2012)	France	Biomarqueurs
	Complété (2014)	Italie	Biomarqueurs
Cancer de la peau	Complété (2013)	Espagne	Biomarqueurs
	En cours (2010)	E.U.	Biomarqueurs
	Complété (2009)	Allemagne	Quantification de Dicer et Drosha
	Complété (2011)	Allemagne	Biomarqueurs
	Complété (2011)	Allemagne	Quantification de TARBP1, TARBP2, AGO1, AGO2, PACT, DCRG8 et RISC
	Complété (2011)	Allemagne	Biomarqueurs
	Complété (2011)	Allemagne	Biomarqueurs
	Complété (2007)	Danemark	Biomarqueurs
Carcinome rénal	Terminé (2010)	France	Biomarqueurs
	Complété (2008)	Chine	Biomarqueurs
Cancer du poumon	Terminé (2010)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2015)	Australie	TargomiR. Utilisation d'un mimétique de miR-16 (mésomiR)
	En cours (2015)	Egypte	Biomarqueurs
	En cours (2014)	Italie	Biomarqueurs
	En cours (2010)	E.U.	Investigation sur Dicer
	En cours (2009)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2009)	Belgique	Biomarqueurs
	Complété (2009)	Israël	Biomarqueurs
Cancer hépatique	Complété (2009)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2013)	E.U.	Injection de MRX34
	En cours (2011)	E.U.	Biomarqueurs
Cancer de la prostate	En cours (2011)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2016)	Belgique	Biomarqueurs
	En cours (2015)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2015)	Pays-Bas	Biomarqueurs
	En cours (2014)	Allemagne	Corrélation entre miR-141 et miR-375 avec la maladie
	En cours (2011)	E.U.	Biomarqueurs
Cancer des reins	Terminé (2010)	Allemagne	Biomarqueurs
	En cours (2008)	Taiwan	Biomarqueurs

Suite (2)

Maladies / Désordres	Statut (Date de début)	Pays	microARNs
Cancer thyroïdien	En cours (2014)	Italie	Biomarqueurs
	Complété (2011)	E.U.	Biomarqueurs
Cancer des glandes surrénales	En cours (2012)	E.U.	Biomarqueurs
Cancer de l'œsophage	Complété (2011)	E.U.	Biomarqueurs
Cancer ovarien	En cours (2016)	Finlande	Biomarqueurs
Tumeur cérébrale	En cours (2016)	Allmagne	Biomarqueurs
	En cours (2013)	E.U.	Quantification de miR-106
	En cours (2013)	France	Biomarqueurs
	En cours (2012)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2010)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2009)	E.U.	Biomarqueurs
	Complété (2010)	Taiwan	Biomarqueurs
Lymphome	En cours (2013)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2008)	E.U.	Biomarqueurs
	Complété (2012)	Corée du Sud	Biomarqueurs
	Complété (2010)	E.U.	Biomarqueurs
Leucémie	En cours (2012)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2012)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2011)	E.U.	Investigation de miR-34a, miR-193e, miR-198, miR-538e
	Complété (2010)	E.U.	Biomarqueurs
Myélome multiple	En cours (2011)	Pays-Bas	Analyse de certains miARNs non spécifiés
	Complété (2008)	Danemark	Biomarqueurs
Cancer pédiatrique	En cours (2012)	E.U.	Biomarqueurs
Sclérose en plaques	En cours (2014)	Allemagne	Biomarqueurs
	En cours (2012)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2011)	Allemagne	Biomarqueurs
	Complété (2013)	E.U.	Biomarqueurs
	Complété (2012)	E.U.	Biomarqueurs
Asthme	En cours (2016)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2014)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2012)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2011)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2009)	E.U.	Biomarqueurs
Sepsis	En cours (2016)	Chine	Biomarqueurs
	En cours (2015)	Singapour	Biomarqueurs
	En cours (2015)	France	Biomarqueurs
	En cours (2014)	E.U.	Biomarqueurs
	Complété (2016)	Chine	Biomarqueurs
	Complété (2014)	Allemagne	Biomarqueurs
Diabète	Complété (2009)	Chine	Biomarqueurs
	En cours (2015)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2014)	Israël	Biomarqueurs
	En cours (2014)	Japon	Biomarqueurs
	En cours (2014)	Quatar	Biomarqueurs
	En cours (2013)	Slovaquie	Biomarqueurs
Diabète de grossesse	Complété (2010)	France	Biomarqueurs
	En cours (2015)	Israël	Biomarqueurs
Autisme	En cours (2016)	E.U.	Biomarqueurs
	Complété (2012)	E.U.	Biomarqueurs
Obésité	Complété (2013)	E.U.	Biomarqueurs
	Complété (2012)	Taiwan	Biomarqueurs
	Complété (2006)	Allemagne	Biomarqueurs
Sclérose latérale amyotrophique	En cours (2013)	France	Biomarqueurs
Maladie d'Alzheimer	En cours (2014)	E.U.	Biomarqueurs
Maladie de Parkinson	En cours (2015)	Taiwan	Biomarqueurs
Apnée du sommeil	En cours (2014)	Brésil	Biomarqueurs
Epilepsie	En cours (2015)	Allemagne	Biomarqueurs



Suite (3)

Maladies / Désordres	Statut (Date de début)	Pays	microARNs
Traumatisme cérébral	En cours (2015)	Autriche	Quantification de let-7i, miR-16, miR-92
	En cours (2014)	E.U.	Biomarqueurs
Psoriasis	En cours (2016)	Autriche	Biomarqueurs
Attaque cardiaque	En cours (2015)	U.K.	Biomarqueurs
	En cours (2014)	Chine	Biomarqueurs
	Complété (2015)	Brésil	Biomarqueurs
	Complété (2013)	Chine	Investigation de miR-126
	Terminé (2013)	U.K.	Biomarqueurs
Infertilité	En cours (2015)	Danemark	Quantification de certains miARNs non spécifiés
	En cours (2014)	Turquie	Biomarqueurs
VIH	En cours (2015)	Espagne	Biomarqueurs
	Complété (2011)	France	Biomarqueurs
	Complété (2010)	E.U.	Investigation sur Dicer
Maladies cardiovasculaires	En cours (2014)	E.U.	Biomarqueurs
	Complété (2012)	Canada	Quantification de miR-21, miR-126, miR-133, miR-146a, miR-221, miR-222, miR-210
Hépatite C	Complété (2008)	Danemark	AntagomiR-122 (SPC3649)
Pré-éclampsie	En cours (2014)	Pays-Bas	Biomarqueurs
Hypertension artérielle	En cours (2014)	Chili	Biomarqueurs
Hypertension pulmonaire	En cours (2014)	Suisse	Biomarqueurs
	En cours (2014)	Chine	Biomarqueurs
	En cours (2013)	E.U.	Biomarqueurs
Syndrome de Cushing	En cours (2015)	Italie	Quantification de miR-1, miR-29, miR-29, miR-133, miR-208, miR-222, miR-223, miR-499 et miR-4454
Dépression	En cours (2015)	E.U.	Biomarqueurs
	Terminé (2012)	Israël	Biomarqueurs
Dysfonctions urinaires	Complété (2011)	Suisse	Biomarqueurs
Sarcoïdose	Complété (2013)	E.U.	Biomarqueurs
Défaillance rénale	En cours (2014)	U.K.	Biomarqueurs
	En cours (2014)	Chine	Biomarqueurs
	Complété (2010)	E.U.	Biomarqueurs
Défaillance hépatique	En cours (2014)	Chine	Biomarqueurs
Défaillance cardiaque	En cours (2015)	Suisse	Investigation de miR-125b, miR-144, miR-208a
Défaillance aortique	En cours (2014)	E.U.	Biomarqueurs
Hémorragie cérébrale	En cours (2015)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2015)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2014)	Danemark	Biomarqueurs
	Complété (2013)	Danemark	Biomarqueurs
Maladies inflammatoires	En cours (2016)	Grèce	Biomarqueurs
	En cours (2015)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2013)	France	Biomarqueurs
Ostéoporose	En cours (2016)	Taiwan	Biomarqueurs
	En cours (2013)	E.U.	Biomarqueurs
Rhinosinusite chronique	En cours (2014)	Chine	Utilisation de mimétiques et d'inhibiteurs de microARNs
Maladies mitochondriales	En cours (2015)	U.K.	Biomarqueurs
Arthrite rhumatoïde & lupus	En cours (2015)	France	Biomarqueurs
Erythémateuse systémique	Complété (2016)	Egypte	Biomarqueurs
Complication post-opératoire	En cours (2014)	E.U.	Biomarqueurs
Leucoencéphalopathie	En cours (2015)	France	Biomarqueurs
Dysplasie fibromusculaire	Complété (2013)	France	Quantification miR-143 et miR-145
Problèmes pulmonaires	En cours (2015)	E.U.	Biomarqueurs
Dystrophinopathie	En cours (2014)	France	Biomarqueurs
Maladie d'Addison	En cours (2014)	Suède	Biomarqueurs
AVC	En cours (2015)	E.U.	Biomarqueurs

Suite (4)

Maladies / Désordres	Statut (Date de début)	Pays	microARNs
Syndrome métabolique	En cours (2015)	México	Biomarqueurs
	En cours (2014)	E.U.	Biomarqueurs
	En cours (2013)	France	Biomarqueurs
Maladie coronarienne	En cours (2016)	Chine	Investigation de miR-320a
	En cours (2015)	Chine	Biomarqueurs
Pancréatite aigue	En cours (2015)	Chine	Biomarqueurs
Ostéoarthrite	En cours (2015)	Allemagne	Biomarqueurs
Dystrophie musculaire de Duchenne	En cours (2013)	Suisse	Biomarqueurs
Abus d'opioïdes	En cours (2013)	Chine	Biomarqueurs
Maladie de Chagas	En cours (2013)	Brésil	Biomarqueurs
Hydrocéphalie	En cours (2015)	E.U.	Biomarqueurs
Neurofibromatose	Complété (2012)	E.U.	Biomarqueurs
Fibrodisplasie	Complété (2014)	E.U.	Biomarqueurs
Hypertriglycéridémie maternel	En cours (2015)	Malaisie	Investigation sur miR-29

**Annexe 6 : Etudes cliniques ayant porté sur les microARNs au début 2016.** VIH, Virus de l'immunodéficience humaine ; AVC, Accident vasculaire cérébral ; E.U., Etats-Unis ; U.K., United Kingdom ; TARBP1, Transactive response RNA-binding protein 1 ; TARBP2, Transactive response RNA-binding protein 2 ; AGO1, Argonaute 1 ; AGO2, Argonaute 2 ; PACT, Protein activator of the interferon-induced protein kinase ; DCRG8, DiGeorge syndrome chromosomal region 8 ; RISC, RNA-induced silencing complex.

